

## 重症喘息における好酸球性炎症制御に関する研究

著者	板倉 康司
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第19061号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00129155">http://hdl.handle.net/10097/00129155</a>

博士論文

重症喘息における好酸球性炎症制御に関する研究

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

内科病態学講座呼吸器内科学分野

板倉 康司

## 目次

1. 略語	P. 2
2. 要約	P. 9
3. 研究背景	
第1章 重症喘息	P. 12
第2章 気道上皮細胞による炎症制御	P. 31
第3章 TAM 受容体チロシンキナーゼ	P. 37
4. 研究目的	P. 41
5. 研究方法	P. 42
6. 研究結果	P. 64
7. 考察	P. 73
8. 結論	P. 83
9. 謝辞	P. 84
10. 引用文献	P. 85
11. 図の説明	P. 131
12. 図	P. 147
13. 表	P. 176

## 略語

ACQ-5	5-Item Asthma Control Questionnaire
ACTB	$\beta$ -actin
ANOVA	analysis of variance
APC	Allophycocyanin
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BMI	body mass index
bp	base pair
BV	Brilliant Violet
CCL	C-C motif chemokine ligand
CCR	C-C motif chemokine receptor
CREB	cyclic adenosine monophosphate response element binding protein
CRTH2	chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells
CSF2	colony stimulating factor 2
CSTA	cystatin A
CXCL	C-X-C motif chemokine ligand
CXCR	C-X-C motif chemokine receptor
DAMPs	damage-associated molecular patterns



DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
ECP	eosinophil cationic protein
EGF	epidermal growth factor
FCER2	Fc fragment of IgE receptor II
FEV <sub>1</sub>	forced expiratory volume in 1 second
FMO	fluorescence minus one
FVC	forced vital capacity
Gas6	growth arrest specific 6
GC	glucocorticoid
GINA	Global Initiative for Asthma
GLCCI1	glucocorticoid-induced transcript 1
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GR	glucocorticoid receptor
GRE	glucocorticoid response element
GRO	growth-regulated peptide
HAT	histone acetyltransferase
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HDAC	histone deacetylase

HDM	house dust mite extract
HE	hematoxylin-eosin
Hi	high
hr	recombinant human
hsp	heat shock protein
ICAM-1	intercellular cell adhesion molecule-1
IFNAR	interferon- $\alpha/\beta$ receptor
Ig	immunoglobulin
I $\kappa$ B $\alpha$	nuclear factor $\kappa$ B inhibitor
IKK	I $\kappa$ B kinase
IL	interleukin
ILC2	group 2 innate lymphoid cell
JAK	janus kinase
LABA	long acting $\beta_2$ agonist
LAMA	long acting muscarinic antagonist
lftSLP	long form of thymic stromal lymphopoietin
Lin	lineage marker
Lo	low

LPS	lipopolysaccharide
LT	leukotriene
LTRA	leukotriene receptor antagonist
MBP	major basic protein
MMP	matrix metalloproteinase
MUC	mucin
NA	not applicable
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NCBI	National Center for Biotechnology Information
neg	negative
NETs	neutrophil extracellular traps
NF $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B
NO	nitrogen monoxide
NR3C1	nuclear receptor subfamily 3 group C member 1
N.D.	not detected
N.S.	not significant
OCT	optimal cutting temperature
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns

PAR	protease-activated receptor
PAS	periodic acid-Schiff
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PC20-Ach	provocative concentration of acetylcholine that results in a 20% fall in %
	predicted values of forced expiratory volume in 1 second
PE	phycoerythrin
PerCP	Peridinin-chlorophyll-protein Complex
PG	prostaglandin
Phospho	phosphorylated
PI3K	phosphoinositide 3 kinase
pos	positive
PROS1	protein S
PRR	pattern-recognition receptors
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RPLP0	ribosomal protein lateral stalk subunit P0
RS	respiratory syncytial

siAxl	Axl-targeting small interfering RNA
siNTC	non-targeting control small interfering RNA
siRNA	small interfering RNA
SARP	Severe Asthma Research Program
SLPI	secretory leukocyte peptidase inhibitor
SNP	single nucleotide polymorphism
SOCS	suppressor of cytokine signaling
SPDEF	SAM pointed domain containing ETS transcription factor
SRT	sustained released theophylline
STAT	signal transducer and activator of transcription
TAM	Tyro3, Axl, Merck
TBX21	T-box transcription factor 21
Th2	type 2 helper T
Th17	type 17 helper T
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor
TSLP	thymic stromal lymphopoietin
U-BIOPRED	Unbiased BIOMarkers in Prediction of REspiratory Disease outcomes

VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
ZO	zonula occludens

## 要約

### 背景

気管支喘息 (以下、喘息) は、成人の約10%が罹患する国民病の一つである。喘息のうち5-15%は既存の治療薬を使用しても症状のコントロールが困難な重症喘息であり、重症喘息の生活の質や生命予後を改善させるために新規治療法の開発が急務である。気道上皮細胞は、pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) や damage-associated molecular patterns (DAMPs) を認識することでサイトカイン、ケモカインを産生し、2型炎症を惹起する起点となる。しかし、気道上皮細胞によって誘導される2型炎症がどのように抑制されているかについては不明な点が多い。TAM (Tyro3、Axl、Mertk) 受容体ファミリーのうちの1つである Axl 受容体チロシンキナーゼは、肺泡マクロファージや樹状細胞に発現し、アポトーシス細胞の貪食による efferocytosis の促進や Toll-like receptor (TLR) シグナルの抑制を介して炎症の収束に寄与する。私は、Axl が気道上皮基底細胞に発現し、インフルエンザウイルス感染による傷害後の気道上皮の細胞増殖と組織修復を促進させることを報告した。しかし、Axl が気道上皮細胞を介した2型炎症にどのように関与しているかは不明である。そこで、本研究では2型気道炎症における Axl の役割を明らかにすることを目的とした。

### 方法

喘息の気道上皮における Axl 発現の変化を検討するため、二つの独立したコホートを用いて、健常者、軽症・中等症喘息、重症喘息の間でヒト気道上皮細胞の遺伝子発現を解析し

た。喘息患者の気管支生検組織の免疫染色により、非喘息、軽症・中等症喘息、重症喘息の間で気道上皮細胞における Axl 蛋白の発現を比較した。喘息患者の気道上皮細胞における Axl 蛋白の発現と、気道組織に浸潤する好酸球数とマスト細胞数の関連について病理組織学的に検討した。2型気道炎症における Axl の機能を解析するため、house dust mite 抽出物 (HDM) をマウスへ経鼻投与し2型気道炎症モデルを作成し、HDM 投与後の *Axl*<sup>-/-</sup>マウス気管、肺組織に浸潤する炎症細胞数をフローサイトメトリーにより定量した。ヒト気道上皮細胞株 (BEAS-2B 細胞) を用いて、small interfering RNA (siRNA) により Axl をノックダウンし、Axl が制御する気道上皮細胞由来のサイトカイン、ケモカインを検討した。

## 結果

ヒト気道上皮細胞の遺伝子発現解析では、二つのコホートの両方において、重症喘息の気道上皮細胞における *AXL* mRNA の発現が有意に低下していた。重症喘息の気管支生検組織では、気道上皮細胞における Axl 蛋白の発現が有意に低下していた。全身性副腎皮質ステロイド投与後の喘息患者の気管支組織に浸潤する好酸球数とマスト細胞数は、いずれも気道上皮細胞の Axl 蛋白の発現と強い負の相関を示した。これらの結果から、気道上皮細胞における Axl の発現低下は、重症喘息における2型気道炎症およびステロイド抵抗性の病態と関連している可能性が示唆された。*In vivo* における検証では、HDM 投与群 *Axl*<sup>-/-</sup>マウス肺組織に浸潤する好酸球数は HDM 投与群野生型マウスと比較し有意な差を認めなかった。一方、HDM 投与群 *Axl*<sup>-/-</sup>マウス気管組織に浸潤する好酸球数は、HDM 非投与群 *Axl*<sup>-/-</sup>マウス



およびHDM投与群野生型マウスと比較して有意に増加した。これらの結果により、Axlは2型気道炎症において好酸球浸潤を抑制していることが明らかとなった。BEAS-2B細胞を用いた *in vitro* の検討では、Axl のノックダウンにより、HDM 刺激後における granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)、regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) の遺伝子および蛋白の発現が有意に上昇した。更に、GM-CSF と RANTES の発現を促進させる転写因子 nuclear factor  $\kappa$  B (NF $\kappa$ B) の活性化阻害因子である phosphorylated A20の発現を検討したところ、Axl のノックダウンによってHDM 刺激後における phosphorylated A20の発現は低下した。これらの結果により、気道上皮細胞に発現する Axl はHDM 刺激時において、A20のリン酸化を促進することでNF $\kappa$ B の活性化を阻害し、GM-CSF と RANTES の遺伝子発現を抑制する可能性が示唆された。

## 結論

本研究は、Axl が好酸球浸潤を抑制することで2型気道炎症を負に制御することを明らかにした。また、Axl は気道上皮細胞においてHDM 刺激時にA20のリン酸化を誘導し、GM-CSF と RANTES の遺伝子発現を抑制することで、好酸球の活性化と組織への浸潤を阻害する可能性が示唆された。更に、気道上皮細胞におけるAxl の発現低下が、重症喘息におけるステロイド抵抗性の2型気道炎症に関与している可能性があることを示した。本研究を発展させることにより、重症喘息の病態解明が進歩し、重症喘息の新規バイオマーカーおよび新規治療の開発が進展することが期待される。

## 研究背景

研究背景は、第1章 重症喘息、第2章 気道上皮細胞による炎症制御、第3章 TAM 受容体チロシンキナーゼ、の3章に分けて記述する。

## 第1章 重症喘息

### 第1節 重症喘息の疫学

気管支喘息 (以下、喘息) は、「気道の慢性炎症を本態とし、変動性を伴った気道狭窄 (喘鳴、呼吸困難) や咳などの臨床症状で特徴付けられる疾患」である<sup>1</sup>。喘息の全世界的な有病率は約5-10%であり、我が国の成人における喘息の有病率は約10%である<sup>23</sup>。1965年まで、日本の喘息による死者 (喘息死) 総数は年間1万人を超えていたものの、1966年に年間1万人を下回り、以後減少し2016年には1454人まで減少した<sup>1</sup>。しかし、既存の治療薬を使用してもコントロール不能な重症喘息が喘息全体の4.7-15.2%存在する<sup>4</sup>。重症喘息は、「コントロールに高用量吸入ステロイドおよび長時間作用性  $\beta_2$  刺激薬 (long acting  $\beta_2$  agonist: LABA)、加えて長時間作用性抗コリン薬 (long acting muscarinic antagonist: LAMA)、ロイコトリエン拮抗薬 (leukotriene receptor antagonist: LTRA)、テオフィリン徐放製剤 (sustained released theophylline: SRT)、経口ステロイド、免疫グロブリン (Immunoglobulin: Ig) E や interleukin (IL) -5を標的とした生物学的製剤の投与を要する喘息、またはこれらの治療でもコントロール不能な喘息」と定義される<sup>1</sup>。喘息死した患者の喘息重症度のうち、重症喘息は最多の約40%を占める<sup>5</sup>。

重症喘息患者は増悪（平常時に比べて明らかに息切れ、咳嗽、喘鳴、胸痛などの呼吸器症状が増強するとともに呼吸機能が低下し、治療の強化・変更をせざるを得ない状況）による頻回の緊急受診や入院治療を余儀なくされ、身体的、精神的に生活の質が低下する<sup>1,6,7</sup>。重症喘息のうち45%が経口ステロイドを連日内服しており、経口ステロイドの連日使用や、喘息発作の度に要する頻回の全身性ステロイド投与は、高血圧、耐糖能異常、骨粗鬆症をはじめとする種々の有害事象を引き起こす<sup>8</sup>。重症喘息ではステロイド抵抗性（1秒率が70%未満で気管支拡張薬により15%以上の気道の可逆性はあるが、プレドニゾン0.5 mg/kg を10-14日間内服しても気管支拡張薬使用前の1秒率の改善が15%未満である状態）が存在することが知られており、経口ステロイドの使用によっても症状のコントロールが困難である<sup>10</sup>。重症喘息の治療に要する医療費および疾病に伴う休職などによる経済的損失は、軽症・中等症喘息と比較し2～4倍であり、重症喘息に関係する医療費は喘息全体の約60%であることが報告されている<sup>11-13</sup>。したがって、重症喘息患者の生活の質と生命予後の改善のために、重症喘息の新規治療法開発が急務である。

## 第2節 重症喘息の病態

### 2-1 重症喘息の炎症病態

喘息はアレルギー性疾患であることが長年知られてきた<sup>14,15</sup>。2型炎症は、寄生虫に対する生体防御機構として機能する一方で、喘息をはじめとするアレルギー性疾患の主病態であ

る<sup>16</sup>。以下に2型炎症の概略を示す。気道へ侵入したアレルゲンは樹状細胞に認識され、所属リンパ節でナイーブヘルパーT細胞へ抗原提示を行うことで、ナイーブヘルパーT細胞からTh2細胞への分化が誘導される<sup>16</sup>。この過程で、気道上皮細胞はIL-25、IL-33、thymic stromal lymphopoietin (TSLP) を産生することで樹状細胞を活性化することができる<sup>17-19</sup>。Th2細胞は、IL-4、IL-5、IL-13をはじめとするサイトカインを分泌し、これらは2型サイトカインと総称される<sup>16</sup>。IL-4はB細胞のIgE産生を誘導し、IgEはマスト細胞を活性化させる<sup>20,21</sup>。IL-5は好酸球の成熟と気道組織への浸潤を強力に誘導する<sup>22</sup>。IL-13は気道上皮細胞の杯細胞過形成を促進することで粘液産生や気道リモデリングを促し、気道過敏性を亢進させる<sup>23,24</sup>。なお、気道リモデリングとは、上皮の傷害、基底膜の肥厚、粘膜下組織の線維化、杯細胞過形成と粘液腺の増大、気道平滑筋の増生、軟骨壁の傷害、気道血管の増生によって特徴付けられる気道の構造変化を表す<sup>23</sup>。近年、T細胞受容体やB細胞受容体を有しないがIL-2、IL-7、IL-33やTSLPで活性化するgroup 2 innate lymphoid cell (ILC2: 2型自然リンパ球) が同定され、IL-5、IL13を分泌することで好酸球の活性化と気道リモデリングを誘導することが報告された<sup>25,26</sup>。このようにTh2細胞やILC2によって活性化される好酸球とマスト細胞は、2型炎症における主要なエフェクター細胞であり、気流制限とも関連する<sup>16,23,27-30</sup>。ここでは、これらの炎症細胞の重症喘息病態における役割について述べる。

## 2-1- i 好酸球

好酸球性気道炎症は、喘息の特徴的な炎症病態である<sup>27,28,31,32</sup>。アレルゲン刺激によって気道上皮から産生される GM-CSF、RANTES、eotaxin などのサイトカイン、ケモカインや、type 2 helper T (Th2) 細胞、ILC2によって分泌される IL-5は、好酸球の成熟、活性化および気道組織への遊走を促進させる<sup>22,33-38</sup>。また、活性化した Th2細胞は、IL-4を産生することにより気道組織中の血管内皮細胞の intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1)、vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) 発現を誘導し、好酸球の血管内から気道組織への浸潤を誘導する<sup>31,39</sup>。成熟した好酸球は major basic protein (MBP)、eosinophil cationic protein (ECP)、eosinophil peroxidase、eosinophil-derived neurotoxin などの細胞内顆粒蛋白を含んでいる<sup>40-42</sup>。気道組織へ浸潤した組織好酸球は、IgG、IgA、血小板活性化因子などの刺激により120分以内という短時間で活性酸素 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) オキシダーゼ) 依存的に崩壊し、細胞内顆粒蛋白を含むクロマチン線維を細胞外へ放出する<sup>43</sup>。細胞外へ放出された顆粒蛋白の表面には、eotaxin-1の受容体である C-C motif chemokine receptor (CCR) 3の細胞外ドメインが発現しており、顆粒蛋白が eotaxin-1に刺激されることによって ECP が分泌されることが近年明らかとなった<sup>43,44</sup>。好酸球の顆粒蛋白は気道上皮に損傷を与えると同時に、線維芽細胞におけるプロテオグリカンの崩壊を抑制することで組織の線維化を誘導する可能性が報告された<sup>45-47</sup>。また、好酸球性気道炎症は重症喘息のうち約50%に存在しており、重症喘息における主要な炎症病態の一つと言える<sup>48</sup>。

Bousquet J, らによる喘息患者43人の気管支生検組織を用いた検討では、健常者の気道組織内には好酸球はほぼ存在していなかったのに対して、喘息の25%の気道組織中に好酸球浸潤が認められ、気道組織中の好酸球数と喘息の重症度が相関していた。更に彼らは、病理組織学的検討により、気道組織中の MBP 沈着が健常者では見られず、患者喘息に特徴的な所見であることを報告した<sup>27</sup>。

このように、好酸球は重症喘息の炎症病態において密接に関連している。

## 2-1- ii マスト細胞

マスト細胞は正常状態において気道、腸管、皮膚を含む全身臓器の血管壁、リンパ管および神経線維の周囲に広く分布している<sup>49-51</sup>。マスト細胞の表面には IgE 高親和性受容体である FcεRI が発現し、IgE を介した抗原特異的なアレルギー反応を惹起する<sup>49,52,53</sup>。マスト細胞には tryptase、leukotriene (LT) D<sub>4</sub>、prostaglandin (PG) D<sub>2</sub>、histamine などの多数の顆粒蛋白が含まれる<sup>54-57</sup>。アレルゲン抗原特異的 IgE の結合によって活性化されたマスト細胞は、これらの顆粒蛋白を放出することで気道収縮、気道粘液産生増加、血管透過性の亢進、血管収縮などの数分単位で起こる即時型反応を惹起し、喘息増悪の誘因となる<sup>58,59</sup>。また、活性化したマスト細胞は遅発型反応として GM-CSF、RANTES、eotaxin-1などの好酸球活性化、遊走促進因子や IL-4、IL-5、IL-13などの2型サイトカインを含む多数のサイトカイン、ケモカインを放出することが報告されており、好酸球浸潤の促進、B 細胞の活性化による2型炎症の増

強や、気道平滑筋の増生、杯細胞過形成による気道リモデリングの亢進を促進させる<sup>60-62</sup>。

更に、活性化したマスト細胞はステロイド投与抵抗性に amphiregulin を産生し、肺線維芽細胞の増殖、気道上皮細胞が分泌する粘液成分である MUC5AC 産生を誘導するため、ステロイド抵抗性の気道リモデリングに寄与する可能性がある<sup>63-64</sup>。また、tryptase および LTD4 は *in vitro* で気道平滑筋の増殖を促進し、気道モデリングに関与している可能性がある<sup>58,65</sup>。

更に、FcεRIγ 鎖欠損マウスの慢性喘息モデルを用いた検討により、IgE 結合による FcεRI 活性化を介さないシグナルで、気道過敏性の亢進、杯細胞過形成および Muc5ac、Muc5b の発現が亢進することが報告されており、マスト細胞は IgE 非依存的にも気道モデリングに関与している可能性が示唆される<sup>66</sup>。

臨床検体を検討すると、喘息死した患者では気道組織中のマスト細胞数は健常者の2倍程度に増加し、気道平滑筋において顕著に増加することが判明している<sup>67-69</sup>。

以上より、マスト細胞は、アレルゲン刺激を介した喘息の増悪、2型炎症の活性化、気道リモデリングの促進によって、喘息の重症化に寄与する。

#### 2-1-iii 好中球

好中球は、気道上皮細胞によって産生される growth-regulated peptide (GRO) -α、IL-8や、気道組織内の好中球により分泌される IL-8によって気道組織へ浸潤する<sup>70-73</sup>。気道上皮細胞による IL-8の産生は、緑膿菌や大腸菌などの細菌感染によって促進される<sup>72-74</sup>。また、type

17 helper T (Th17) 細胞によって産生される IL-17A は、tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$  による刺激と相乗して気道上皮の IL-8産生を促進させる<sup>75</sup>。成熟した好中球は、matrix metalloproteinase (MMP)、elastase、cathepsin G などの酵素やプロテアーゼのほか、LTB4などの脂質メディエーター、活性酸素種などを放出する<sup>76-80</sup>。好中球顆粒に含まれる好中球 elastase は、TLR4を介して気道上皮の IL-8産生を促進させ、更なる好中球の遊走を促進させる<sup>81</sup>。In vitro で IL-8によって活性化された好中球は、MMP-9、LTB4を放出することで好中球の基底膜通過能力を促進するため、気道組織への浸潤を誘導する可能性が示唆される<sup>82</sup>。また、in vitro において、好中球は respiratory syncytial (RS) ウイルス感染刺激時の気道上皮の傷害と細胞接着の傷害を誘導する<sup>83</sup>。好中球エラスターゼを含む neutrophil extracellular traps (NETs) はライノウイルス感染によって誘導される2型炎症増強と喘息の増悪に関与する<sup>84</sup>。

更に近年、好中球は IgE によって活性化されたマスト細胞により刺激され、CD4陽性 T 細胞への抗原提示細胞として機能し T 細胞を活性化することで、アレルギー性炎症を増強する可能性が示された<sup>85</sup>。

また、後述するが、好中球は IL-8による刺激でステロイド刺激に対する感受性が低下し、アポトーシスが抑制され生存が延長するため、重症喘息における好中球炎症の存在はステロイド抵抗性に関与している可能性がある<sup>86</sup>。

実際に、重症喘息では喀痰中の好中球増加が見られ、人工呼吸管理が必要な重症の喘息増



悪を来した患者の気管内吸引物中では IL-8 と好中球数が増加している<sup>87,88</sup>。更に、重症喘息の気管支組織では軽症喘息と比較して有意に好中球、IL-17A 陽性細胞、IL-17F 陽性細胞の数が増加し、気管支組織の IL-17F 陽性細胞が好中球数、喘息増悪の回数と相関していることが報告された<sup>30</sup>。

このように好中球は、喘息においては気道組織への傷害だけでなく、好酸球気道組織浸潤の活性化、NETs の放出、CD4陽性 T 細胞の活性化などにより2型炎症を増強させる作用を持つ。

## 2-2 フェノタイプ、エンドタイプ

フェノタイプとは「遺伝子型と環境の相互作用によってもたらされる生物の観察可能な特性」、エンドタイプとは「明確な病態生理を伴う疾患のサブセット」と定義される<sup>89,90</sup>。

重症喘息の病態を解明するために、これまでに種々のフェノタイプ分類が行われてきた。

2008年に喘息のフェノタイプ分類を目的としてクラスター解析が行われ、早期発症アトピー型と肥満非好酸球性炎症型の2つのクラスターが報告された<sup>91</sup>。2010年には米国 Severe Asthma Research Program (SARP) が、(1) 早期発症、軽症、アトピー型、呼吸機能正常、(2) 早期発症、軽症～中等症、アトピー型、可逆性気流制限、(3) 高齢発症、重症、非アトピー型、可逆性気流制限、肥満、(4) 早期発症、重症、アトピー型、可逆性気流制限、(5) 高齢発症、重症、非アトピー型、固定性気流制限の5つのクラスターを同定した<sup>92</sup>。その後、喀痰中

好中球優位型および喀痰中好酸球・好中球混合型の重症喘息クラスターが報告された<sup>87</sup>。

2017年、Opina MT, らはこれまで報告された重症喘息のクラスターに類似性があることを指摘し、(1) 早期発症、アトピー型、(2) 高齢発症、非アトピー型、喀痰中好酸球優位、(3) 高齢発症、非アトピー型、喀痰中好中球優位型の3分類に大別した<sup>93</sup>。これらのフェノタイプ分類は、重症喘息の病態解明およびエンドタイプの同定を行う上で有用な指針となる可能性がある。

Muraro A, らはこれまでに行われたフェノタイプ分類に基づいて、喘息のエンドタイプを下記のように分類した<sup>94</sup>。はじめに喘息を2型炎症型と非2型炎症型に分別し、2型炎症型は、(1) 好酸球性炎症、(2) 抗原特異的 IgE、(3) 気道過敏性と気道リモデリングの3つのフェノタイプに分類し、非2型炎症型は、(1) 好中球性炎症、(2) 顆粒球寡少型炎症、(3) 気道過敏性と気道リモデリングの3つのフェノタイプに分類した。これらのフェノタイプそれぞれにおける主要な促進因子であるサイトカイン、メディエーターや特徴的な病理組織学的異常などのバイオマーカーを列挙しまとめることで、各フェノタイプに対応するエンドタイプを提唱した。また、Ricciardolo FLM, らは、頻回増悪を起こす好中球性炎症型の重症喘息における IL-17F 誘導性エンドタイプを報告した<sup>30</sup>。これらのエンドタイプに関連するバイオマーカーは、新規治療法が有効な患者群を適切に選択する上で今後有用となる可能性がある。

## 2-3 喘息の増悪

喘息の増悪における最も多い原因はウイルス感染症であり、ウイルス感染症は増悪の原因のうち約80%を占める<sup>95,96</sup>。増悪の引き金となる上気道炎の原因ウイルスはRSウイルス、ライノウイルス、インフルエンザウイルスなどである<sup>97</sup>。RSウイルスによる増悪は特に小児に多いものの、成人でも喘息による入院のうち7%をRSウイルス感染症が占める<sup>96,98</sup>。喘息の気道上皮では、ウイルス感染に対して防御的に機能するI型インターフェロンの産生が低下することが報告されており、喘息における気道上皮はウイルス感染に対して脆弱である可能性が示唆される<sup>99,100</sup>。ウイルス感染の他には、アレルギー性喘息ではアレルゲン曝露が抗原特異的IgEによるアレルギー反応を介した増悪の原因となる<sup>53</sup>。

増悪には緊急受診を要さない軽微なものから、緊急受診や入院を要するもの、喘息死の原因となる重篤なものまでが存在し、重症増悪とは、「入院または1時間以上の緊急的な治療および経過観察を要する状態、または増悪による死亡」を指す<sup>101</sup>。重症増悪のリスク因子は肥満、5-Item Asthma Control Questionnaire (ACQ-5) スコア不良、気管支拡張薬吸入によっても改善しない1秒率低下、発作時の気管支拡張薬の使用、および重症度 Global Initiative for Asthma (GINA) ステップ4 以上であることが報告された<sup>102</sup>。重症増悪は経年的な呼吸機能低下の危険因子であることが明らかとなっており、患者の生活の質と生命予後の改善のためには、特に重症増悪を抑制することが必要である<sup>103</sup>。

吸入ステロイドの使用は増悪、重症増悪のリスクを減らすことが明らかとなっているもの

の、既存の治療では全ての増悪を制御することはできない<sup>104,105</sup>。また、吸入ステロイドの使用がウイルス感染による喘息増悪を抑制する機序の詳細はまだ明らかになっていない。増悪の抑制は、喘息患者の生命予後改善や、経口ステロイドの使用の低減によるステロイドの全身性副作用の軽減を可能にすると考えられるため、増悪の抑制を実現する新規治療法の開発が望まれる。

## 2-4 ステロイド抵抗性

重症喘息の中には、気管支拡張薬と吸入ステロイドまたは経口ステロイドを使用しても气流制限が改善しない患者群が存在し、ステロイド抵抗性の克服が重症喘息の症状軽減にとって重要である<sup>92</sup>。ここでは、はじめにステロイドの作用機序を述べ、次にステロイド抵抗性の獲得の機序について記述する。

### 2-4- i ステロイドの作用機序

Glucocorticoid receptor (GR) は全身の細胞に発現し、スプライシングバリエーションとして GR $\alpha$ 、GR $\beta$  が存在する<sup>106,107</sup>。GR $\alpha$  はリガンドであるグルココルチコイド (glucocorticoid: GC) と結合可能であり、細胞質内の GR $\alpha$  に GC が結合すると、GR $\alpha$  から heat shock protein (hsp) 90が解離することで GR $\alpha$  が核内へ移行し、DNA 上 の glucocorticoid response element (GRE) に結合する<sup>108</sup>。一方、GR $\beta$  は GC と結合せず、GR $\alpha$  と拮抗して GRE に結合し、更に GR $\alpha$

と結合しヘテロダイマーを形成することで、GR $\alpha$ の活性を抑制する<sup>107,109</sup>。GREに結合したGR $\alpha$ は、核内のNF $\kappa$ B蛋白とヘテロダイマーを構成するcyclic adenosine monophosphate response element binding protein (CREB)-binding proteinを介してNF $\kappa$ Bを活性化するhistone acetyltransferase (HAT)の活性を阻害することで、NF $\kappa$ Bを介したGM-CSFなどの炎症性サイトカインの転写を抑制する<sup>110-112</sup>。さらに、GREに結合したGR $\alpha$ はhistone deacetylase (HDAC)2を誘導しヒストンの脱アセチル化を促進することで、炎症性サイトカインの転写を抑制する<sup>112</sup>。

細胞レベルでは、GCはヒト末梢血CD8陽性T細胞のIL-10産生を促進しIL-4、IL-5の産生を抑制するが、IL-10はマスト細胞のIgE、GM-CSF、TNF- $\alpha$ の産生抑制、好酸球の生存抑制、樹状細胞の成熟抑制、PBMCのIL-4、IL-5、IL-13産生抑制など2型炎症における多機能の抑制性サイトカインであることが知られている<sup>113-118</sup>。

実際に臨床検体の解析においては、全身性ステロイドは喘息の気道過敏性を改善させ、気道組織に浸潤するT細胞、好酸球、マスト細胞を減少させることが明らかとなっている<sup>119</sup>。

## 2-4-ii ステロイド抵抗性の獲得

### A) GR $\alpha$ の感受性低下

Sher ER, らはステロイド抵抗性の喘息由来の末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cell: PBMC) を解析し、ステロイド抵抗性喘息ではステロイド感受性喘息と比較して末梢血

T 細胞における  $\text{GR}\alpha$  の GC 結合能が低下しており、IL-2と IL-4による共刺激が  $\text{GR}\alpha$  の GC 結合能低下に寄与することを報告した<sup>120</sup>。その後、ステロイド抵抗性喘息の気管支肺胞洗浄液中では、IL-2、IL-4、および IL-5が全身性ステロイド投与後にも低下しないことが示され、これらのサイトカインを介したステロイド抵抗性の獲得が示唆された<sup>121</sup>。

#### B) $\text{GR}\beta$ の発現亢進

ステロイド抵抗性喘息の肺胞マクロファージ中では、ステロイド感受性喘息と比較して優位に  $\text{GR}\beta$  の mRNA 発現が亢進しており、 $\text{GR}\beta$  のノックダウンにより  $\text{GR}\alpha$  の核内移行障害が改善する<sup>122</sup>。また、 $\text{GR}\beta$  は重症喘息の気管支肺胞洗浄液中の細胞において HDAC2のプロモーターを活性化してステロイド抵抗性に関与する可能性がある<sup>123</sup>。

#### C) HDAC の活性低下

重症喘息の PBMC では軽症・中等症喘息と比較して HDAC の活性が低下しステロイド抵抗性に関与する可能性が示唆される<sup>124</sup>。

#### D) IL-10産生の低下

ステロイド抵抗性喘息の PBMC では GC 刺激による IL-10産生能が低下しており、ステロイド抵抗性と IL-10が関連している可能性が示唆される<sup>125</sup>。

#### E) 好中球の関与

好中球では IL-8 による刺激で GR $\beta$  の発現が亢進し、GR $\alpha$ -GR $\beta$  ヘテロダイマーの増加を経てステロイド抵抗性を獲得し、アポトーシスが抑制される<sup>86</sup>。Th17細胞によって産生される IL-17A と IL-17F は気道上皮細胞の GR $\beta$  の発現を誘導し、GR $\alpha$  の抗炎症性作用に拮抗することでステロイド抵抗性に関与する<sup>126</sup>。Ovalbumin を用いたマウス喘息モデルにおいて、IL-17A と IL-17F を産生する Th17細胞がステロイド抵抗性の好中球性気道炎症を惹起することが報告された<sup>127</sup>。

#### F) ILC2の関与

ILC2は IL-33と TSLP の共刺激により活性化されると、TSLP によって誘導される signal transducer and activator of transcription (STAT) 5のリン酸化と B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL) の発現を介してステロイド抵抗性を獲得し、好酸球性気道炎症を惹起する<sup>25</sup>。

#### G) 一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) の関与

これまでのゲノムワイド関連解析の蓄積により、喘息発症のリスク遺伝子として *IL33*、*TSLP*、*IL4*、*IL13*などの SNP が明らかにされてきた<sup>128-131</sup>。また、*glucocorticoid-induced transcript 1 (GLCC1)*、*Fc fragment of IgE receptor II (FCER2)*、*T-box transcription factor 21 (TBX21)* などの SNP が、喘息のステロイド抵抗性に関連する SNP として報告された<sup>132-134</sup>。更に、重症

喘息40名における少数の検討ではあるものの、GR をコードする遺伝子である *nuclear receptor subfamily 3 group C member 1 (NR3C1)* の SNP がステロイド抵抗性と関連することが明らかとなった<sup>135</sup>。

## 2-5 気道リモデリング

喘息の気道に特徴的な病理学的所見として、気道上皮の剥離、杯細胞過形成、基底膜肥厚、粘膜下組織の線維化、平滑筋の増生、血管新生などのリモデリングが認められる<sup>136-141</sup>。気道リモデリングは気道抵抗を増大させ、平滑筋の収縮や気道粘液の貯留による気道閉塞をもたらし、不可逆的な気流制限を引き起こす<sup>142,143</sup>。

気道上皮細胞によって産生される上皮成長因子 (epidermal growth factor: EGF) は、好酸球と筋線維芽細胞による transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) の産生を誘導し、筋線維芽細胞による間質への細胞外基質、膠原線維の産生を促進させる<sup>144,145</sup>。また、喘息患者の気道上皮細胞は periostin を多量に産生することで、筋線維芽細胞の TGF- $\beta$  産生と膠原線維の沈着を誘導する<sup>146</sup>。気道上皮細胞だけではなく、気道組織に浸潤する好酸球も TGF- $\beta$  を産生することによって筋線維芽細胞の膠原線維の産生を誘導する<sup>145,147</sup>。

血管新生は、Th2細胞や ILC2によって産生される IL-13刺激によって活性化した気道上皮細胞が産生する血管内皮増殖因子によって誘導される<sup>24,38</sup>。

杯細胞過形成は、気道上皮の線毛細胞またはクラブ細胞が形質分化転換することで促進さ



れる<sup>148</sup>。傷害を受けた気道上皮細胞によって誘導される EGF、amphiregulin や、Th2細胞と ILC2により産生される IL-4、IL-13は、線毛細胞やクラブ細胞の SAM pointed domain containing ETS transcription factor (SPDEF) 遺伝子の発現を促進させることで、杯細胞への分化形質転換を誘導する<sup>148,149</sup>。杯細胞過形成によって誘導される過剰な粘液産生は気道閉塞を引き起こし、重症増悪の誘引となり得る<sup>137</sup>。

### 第3節 重症喘息の治療

喘息の長期管理における最重要薬剤は吸入ステロイドであり、本邦の「喘息予防・管理ガイドライン2018」においては全ての治療ステップにおいて使用が推奨されている<sup>1</sup>。治療ステップに応じて、吸入ステロイドの増量、LABA、LAMA、SRT、LTRA などの薬剤が使用される。喘息発作時には、主に吸入短時間作用性  $\beta_2$ 刺激薬や全身性ステロイドが投与される。高用量の吸入ステロイドおよび LABA、LAMA、SRT、LTRA を使用しても症状の抑制が困難である場合は、経口ステロイド、抗 IgE 抗体、抗 IL-5抗体、抗 IL-5受容体  $\alpha$  抗体、抗 IL-4受容体  $\alpha$  抗体の使用が考慮される。

近年相次いで発売された抗体製剤は、特定のフェノタイプの重症喘息に対して高い治療効果をあげている。我が国で2012年から使用可能となった抗 IgE 抗体 omalizumab は、実臨床での使用において、アトピー型重症喘息に対して45～84%の年間増悪抑制効果を示した<sup>150</sup>。我が国で2016年に保険承認された抗 IL-5 抗体 mepolizumab は、第2相試験においてプラセボ

群と比較して32%の年間増悪抑制効果、薬剤投与開始前と比較して50% (プラセボ群0%) の経口ステロイド減量効果を認めた<sup>151</sup>。2018年に上梓された抗 IL-5受容体  $\alpha$  抗体 benralizumab は、第2相試験において好酸球性の気道炎症を持つ重症喘息に対してプラセボ群と比較して最大70%の増悪抑制効果、薬剤投与開始前と比較して75% (プラセボ群25%) の経口ステロイド減量効果をもたらした<sup>152</sup>。更に、2019年に保険承認された抗 IL-4受容体  $\alpha$  抗体 dupilumab は、第2相試験において経口ステロイド内服中の重症喘息においてプラセボ群と比較して59%重症増悪を抑制し、薬剤投与開始前と比較して70.1% (プラセボ群41.9%) の経口ステロイド減量効果をもたらした<sup>153</sup>。

第3相試験が進行中の抗 TSLP 抗体 tezepelumab は、第2相試験で中等症・重症喘息患者において末梢血好酸球数によらずプラセボ群と比較して最大71%の増悪発生率の低下をもたらしたため、今後の臨床応用が期待される<sup>154</sup>。

抗 IL-17受容体  $\alpha$  抗体である brodalumab は、第2相試験において重症喘息における呼吸機能や症状の改善を示さなかった<sup>155</sup>。しかし、この臨床試験では好中球性炎症優位型の喘息患者が選択されていないため、今後さらなる検討が必要である。

これらの抗体製剤は非常に高価であり、長期投与が必要となることが問題点である。したがって、抗体製剤が有効な患者群を見分けるバイオマーカーの確立や、新たな治療法の開発が望まれる。

抗体製剤以外にも、2型炎症、好中球性炎症に関与する受容体アンタゴニストが複数開発さ

れている。PGD2の受容体である chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells (CRTH2) アンタゴニストの fevipiprant は、アトピー型喘息を対象とした第2相試験においてプラセボと比較して増悪の抑制傾向を認めており、第3相試験の結果が期待される<sup>156</sup>。

RANTES、eotaxin-1、eotaxin-2、および eotaxin-3の受容体である CCR3アンタゴニストは開発されたものの、毒性が報告されたため長期投与による臨床試験は行われていない<sup>157</sup>。GRO- $\alpha$ 、IL-8の受容体である C-X-C motif chemokine receptor (CXCR) 2に対するアンタゴニストは、第2相試験における重症喘息を対象とした6ヶ月間の観察では増悪抑制効果を認めなかった<sup>158</sup>。上述した brodalumab の臨床試験の結果と併せて、好中球性炎症を伴う重症喘息の増悪抑制は今後の課題である。

気管支サーモプラスティーは、気管支鏡下を用いて気管支内腔に高周波プローブで65℃で温熱負荷を行い、気道平滑筋を減少させることで気道収縮を抑制する新規の非薬物治療法であり、本邦では2015年から重症喘息に対する治療として保険適応となった<sup>159</sup>。気管支サーモプラスティー前後のヒト検体を用いた解析により、気管支サーモプラスティーは、気道平滑筋の減少だけでなく、気管支の神経終末の切断によってアセチルコリンを介した粘液の過分泌を抑制できる可能性が示された<sup>160,161</sup>。気管支サーモプラスティーは新規治療法であり、本邦ではまだ長期的な治療効果の報告は蓄積していないものの、Chupp G, らは、3年間の長期観察において、気管支サーモプラスティーにより、重症増悪を来す患者割合は気管支サーモプラスティー施行前と比較し45%減少したことを報告した<sup>162</sup>。気管支サーモプラス

ティール実施にあたっては、3週間以上の間隔をあけて計3回の入院の上での気管支鏡処置が必要となるため、患者の負担が大きいこと、治療費が高額となることが問題点である<sup>16)</sup>。

## 第2章 気道上皮細胞による炎症制御

### 第1節 パターン認識受容体

気道上皮は外的環境と接しており、細菌・真菌・ウイルスなどの病的抗原、異物やアレルゲンの侵入を認識し、免疫応答の起点となる。気道上皮にはパターン認識受容体 (pattern-recognition receptors: PRR) と呼ばれる抗原や異物を認識する受容体が発現しており、TLR、protease-activated receptor (PAR) などの PRR が知られている<sup>163-165</sup>。これらの PRR は、微生物に特有の共通成分である PAMPs や、損傷を受けた細胞や細胞外基質から放出される成分である DAMPs を認識し、細胞内シグナルを活性化することで種々のサイトカインやケモカインの上皮からの放出を促進させ、炎症細胞の組織浸潤を惹起する<sup>166-169</sup>。

ヒト気道上皮細胞には TLR1から TLR10まで10種類の TLR が発現している<sup>163</sup>。これらのうち、リポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS) をリガンドとする TLR4は、喘息の代表的なアレルゲンの一つである house dust mite 誘導性の2型気道炎症において必須である<sup>168</sup>。TLR4が LPS を認識すると、アダプター分子である Myd88を介して転写因子である NFκB が活性化され、気道上皮細胞から IL-1α、IL-1β、IL-33をはじめとする IL-1ファミリー、IL-25、TSLP、GM-CSF などのサイトカイン、ケモカインが分泌される<sup>170-177</sup>。

House dust mite や papain などの植物由来アレルゲンはプロテアーゼ活性を持つ<sup>178</sup>。PAR の一種である PAR-2は、代表的な house dust mite であるヤケヒョウヒダニ (*Dermatophagoides pteronyssinus*) 由来アレルゲン Derp 1およびコナヒョウヒダニ (*Dermatophagoides farinae*) 由

来アレルゲン Der f3、トリプシン、パパイン、花粉およびゴキブリ由来のプロテアーゼアレルゲンに応答して GM-CSF、RANTES、IL-8などの炎症性サイトカイン、ケモカインを気道上皮細胞から分泌させ、好酸球や好中球の遊走、浸潤を促進する<sup>164,179-182</sup>。

第1章第2節 (2-1) でも述べたように、気道上皮細胞によって産生される IL-25、IL-33、TSLP は樹状細胞を活性化し抗原提示能力を促進させることで、ナイーブヘルパーT細胞を Th2細胞へ分化させ活性化させる<sup>17-19</sup>。活性化した Th2細胞は、IL-4、IL-5、IL-13をはじめとする2型サイトカインを分泌し、好酸球とマスト細胞を活性化させる<sup>18,20-22</sup>。第1章第2節 (2-5) で前述したように、IL-13は気道上皮細胞の杯細胞過形成を促進することで粘液産生や気道リモデリングを促す<sup>24</sup>。更に、TSLP はマスト細胞にも作用し、IL-1と TNF- $\alpha$  による共刺激により活性化されたマスト細胞は IL-13などのサイトカインを放出する<sup>176</sup>。

GM-CSF は、house dust mite 誘導性の2型気道炎症において樹状細胞を活性化し、リンパ節への遊走を促進させることで Th2反応の増強に関与する<sup>177,183,184</sup>。また、GM-CSF は *in vivo* において気道組織への好酸球遊走を促進させ、喘息患者の気道に存在する好酸球の生存を延長させる<sup>185</sup>。

RANTES は好酸球の遊走を促進させるケモカインである<sup>186</sup>。気道上皮細胞における RANTES の産生分泌はウイルス感染時の IFN- $\gamma$  刺激によって顕著に促進される<sup>72,187</sup>。TNF- $\alpha$ 、IL-4、IL-13による刺激も気道上皮細胞の RANTES 産生を促進し、2型炎症における好酸球遊走を誘導する<sup>35,72</sup>。

## 第2節 細胞間接着

気道上皮細胞は PAMPs、DAMPs を認識することで炎症を惹起し免疫応答を指揮している一方で、病的抗原やアレルゲン、異物などが生体に侵入しないようにするための物理的なバリアとしての防御機能も担っている。気道上皮細胞のバリア機能は細胞間接着によって維持されており、気道上皮細胞の細胞間接着は頂端面に存在する密着結合と、頂端面よりも基底膜側に位置する接着結合に分類される<sup>188,189</sup>。

### 2-1 密着結合

密着結合は occludin、claudin、junction adhesion molecule、coxsackievirus and adenovirus receptor などの細胞膜貫通型接着蛋白によって構成される<sup>190-194</sup>。これらの細胞膜貫通型接着蛋白は、細胞膜直下に存在する zonula occludens (ZO) 蛋白をはじめとする蛋白によって裏打ちされ、アクチン細胞骨格へと接続されることによって構造を維持している<sup>188,195</sup>。マウス I 型肺胞上皮細胞を構成する Claudin ファミリーのうち約半数の遺伝子発現量を担う Claudin-18 を欠損したマウスは、密着結合の破綻により正常状態において気道上皮細胞バリア機能の障害を来すため、Claudin は気道上皮細胞の恒常性維持に必須である<sup>196,197</sup>。

密着結合の破綻は、アレルギー性炎症とも関連する。House dust mite 由来のプロテアーゼである Der p 1 や Der f 1 は、密着結合を破壊し気道上皮細胞に傷害を与える<sup>198,199</sup>。

## 2-2 接着結合

接着結合は細胞膜貫通型蛋白 E-cadherin によって形成され、細胞膜下の  $\alpha$ -catenin、 $\beta$ -catenin によって裏打ちされている<sup>200,201</sup>。これらの細胞間接着により、正常状態の気道上皮細胞は一定のイオン非透過性を保っており、細胞間接着の機能維持を評価する際には、経上皮電気抵抗の測定が汎用されている<sup>202</sup>。

喘息患者の気道では健常者と比較して ZO 蛋白の一種である ZO-1 の蛋白発現が優位に低下しており、喘息患者由来の培養気道上皮細胞では経上皮電気抵抗が低下することが明らかとなっている<sup>203</sup>。したがって、喘息では細胞間接着の脆弱性に起因するバリア機能の低下がアレルゲンやウイルスの気道上皮への侵入を招き、炎症病態に関与している可能性が示唆される。

## 第3節 線毛輸送、粘液産生、プロテアーゼインヒビター産生

### 3-1 線毛輸送

気道上皮細胞による異物排除は線毛輸送と粘液産生によって行われる。気道上皮細胞の線毛は運動性を有しており、線毛の運動機能の欠失を呈する原発性線毛運動不全症では慢性副鼻腔炎や反復性の下気道炎症を繰り返し、呼吸機能低下を引き起こす<sup>204</sup>。



### 3-2 粘液産生

気道上皮における粘液は杯細胞、クラブ細胞および粘膜下組織の粘液腺によって産生される。細気管支より末梢では粘液腺は存在せず、杯細胞とクラブ細胞が粘液産生を担っている<sup>205</sup>。気道粘液の主成分はムチンであり、健常者の気道上皮のムチンは主に MUC1、MUC5AC、MUC5B によって構成される<sup>206</sup>。MUC5AC は喘息や急性肺障害において NF $\kappa$ B を介して発現が上昇するものの、マウスでは Muc5ac のみの発現上昇は気道閉塞をもたらさない<sup>206-208</sup>。Muc5ac 欠損マウスは正常状態では異常をきたさないものの、Muc5b 欠損マウスは粘液の過剰な蓄積による気道閉塞や細菌による下気道感染症を自然発症し、マクロファージの機能異常を呈することから、Muc5b は気道の恒常性維持に必須である<sup>207,209</sup>。

気道粘液中には IgA を中心とした免疫グロブリンや、ライソゾーム、defensin などの抗菌ペプチドが含まれており、これらは細菌感染に対して防御的に作用している<sup>210-214</sup>。

また、気道粘液中に存在するラクトフェリンは細菌の細胞膜上の LPS に結合することで TLR4、NF $\kappa$ B を介した炎症を抑制的に制御する機能や、ブタクサ花粉抽出物によるマウス喘息モデルにおいて防御的作用を持つことが報告されている<sup>215-217</sup>。

### 3-3 プロテアーゼインヒビター産生

気道粘液中には  $\alpha$ -1 antitrypsin、secretory leukocyte peptidase inhibitor (SLPI)、cystatin A (CSTA) などの内因性プロテアーゼインヒビターが存在する<sup>218-220</sup>。House dust mite、ゴキブリ、植物、

真菌などのアレルゲンはプロテアーゼ活性を持つ<sup>221</sup>。これらのプロテアーゼアレルゲンは気道上皮細胞による即時的な IL-33分泌促進と IL-33の活性化を誘導し2型炎症を惹起するのに加えて、第2章第1節で述べたように PAR を介した気道上皮細胞による炎症性サイトカイン、ケモカインを誘導するため、気道上皮におけるプロテアーゼインヒビターは2型炎症の抑制において重要である<sup>221,222</sup>。セリンプロテアーゼである SLPI は、重症喘息において気道上皮細胞における発現が低下しており、マウスモデルにおいても2型気道炎症を抑制する<sup>223</sup>。システインプロテアーゼである CSTA は、好酸球性副鼻腔炎患者の鼻粘膜上皮における発現が低下していることが報告されており、*in vitro* でヒト気道上皮細胞株による IL-25、IL-33、TSLP 産生を抑制するため、2型気道炎症の抑制に関与することが示唆される<sup>220</sup>。

### 第3章 TAM 受容体チロシンキナーゼ

#### 第1節 TAM 受容体の活性化とシグナル伝達

TAM 受容体とは、Tyro3、Axl、Mertk の3種類の受容体チロシンキナーゼファミリーの総称である<sup>224</sup>。TAM 受容体の概略を図1に示す。TAM 受容体は樹状細胞、肺泡マクロファージを含むマクロファージ、セルトリ細胞、網膜色素上皮細胞などに発現する<sup>224-229</sup>。TAM 受容体には、共通の TAM リガンドとして growth arrest specific 6 (Gas6)、protein S が存在する<sup>230-232</sup>。Gas6は Tyro3、Axl、Mertk のいずれにも高親和性のリガンドである一方、protein S は Tyro3、Mertk のみに高親和性であり、Axl に対しては低親和性のリガンドである<sup>233</sup>。TAM リガンドは、アポトーシス細胞の細胞膜に発現する phosphatidylserine にビタミン K 依存性に結合することで、TAM 受容体とアポトーシス細胞を橋渡しする<sup>234-236</sup>。TAM リガンドが phosphatidylserine と結合すると、TAM 受容体はヘテロダイマーを形成し細胞膜内のチロシンキナーゼドメインがリン酸化されることで活性化し、細胞内のシグナル伝達を開始させる<sup>237-239</sup>。TAM 受容体の活性化による細胞内シグナルは、phosphoinositide 3 kinase (PI3K)/AKT 経路を介したマクロファージのアポトーシス細胞貪食による efferocytosis の促進、janus kinase (JAK) -STAT 経路の抑制因子である suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1、SOCS3の誘導を介した樹状細胞の TLR シグナルの抑制がある<sup>240-242</sup>。このように、TAM 受容体はアポトーシス細胞を認識することで細胞内シグナル伝達を担う点で特徴的な受容体チロシンキナーゼである。

## 第2節 TAM 受容体による恒常性維持

アポトーシス細胞は、マクロファージをはじめとする貪食細胞に速やかに貪食される一方、正常に貪食されないアポトーシス細胞は secondary necrosis を引き起こして細胞内蛋白を放出することで過剰な炎症を惹起する<sup>243,244</sup>。TAM 受容体を介したマクロファージによる efferocytosis は、免疫寛容の維持や、マクロファージによる抗炎症性サイトカイン産生や炎症後の組織修復にとって重要である<sup>243,245,246</sup>。TAM 受容体それぞれの単一ノックアウトマウスは正常状態において野生型マウスと同様の発現型を示すものの、トリプルノックアウトマウスでは正常状態においても下顎リンパ節と脾臓の著しい腫脹とリンパ球の増殖を認め、過剰な自己免疫反応を示す<sup>229,247</sup>。Mertk は正常状態におけるアポトーシス細胞認識を介して、樹状細胞、T 細胞、B 細胞の免疫寛容を保ち恒常性の維持に寄与している<sup>248-251</sup>。

## 第3節 気道炎症における TAM 受容体の役割

Mertk を介した efferocytosis が正常状態における恒常性の維持にとって重要であるのに対して、Axl、Tyro3 は炎症の抑制にとって重要である。

Axl は、樹状細胞においてウイルス感染刺激によって誘導される interferon- $\alpha/\beta$  receptor (IFNAR) によって発現が促進され、SOCS1、SOCS3 の発現を誘導することで IFNAR シグナルのネガティブフィードバックとして機能する<sup>242</sup>。マウスインフルエンザウイルス感染モデルにおいて、樹状細胞に発現する Axl は過剰な IFNAR シグナルを抑え、抗ウイルス炎症に

おける T 細胞の機能を維持することで炎症を抑制し、生命予後を改善させる<sup>226</sup>。また、

Fujimori T, らは、Axl が肺胞マクロファージの efferocytosis を促進し、マウスのインフルエンザウイルス感染後の炎症収束に寄与することを示した<sup>228</sup>。

肺胞マクロファージによる efferocytosis は、自然免疫だけではなく2型炎症においても関連することが報告されている。喘息患者の喀痰中の好酸球はステロイド投与によりアポトーシスしマクロファージに貪食されるが、喘息患者の肺胞マクロファージでは健常者と比較して有意に Axl の発現が低下しており、efferocytosis の機能低下と関連する<sup>252,253</sup>。また、Chan PY, らは、*Tyro3*<sup>-/-</sup>マウスと *Axl*<sup>-/-</sup>*Mertk*<sup>-/-</sup>マウスを用いた検証により、CD4<sup>+</sup>T 細胞によって産生される protein S によって活性化した樹状細胞に発現する Tyro3を介して、樹状細胞による RANTES などのケモカイン産生が抑制されることで、肺における2型炎症が負に制御されることを報告した<sup>254</sup>。

近年、私の研究グループは、Axl が気道上皮基底細胞にも発現することを見出し、マウスインフルエンザウイルス感染後の気道上皮細胞の細胞増殖を促進させ、気道上皮の修復に寄与することを報告した<sup>255</sup>。しかし、Axl が気道上皮細胞を起点として誘導される2型炎症をどのように制御しているかについては明らかになっていない。更に、炎症の起点となる気道上皮細胞がどのように炎症を抑制しているかについては、未だに不明な点が多い。

本研究では、喘息患者の気道上皮細胞の遺伝子発現と喘息患者の気管支生検組織を解析することで、喘息の気道上皮細胞における Axl の発現変化を検討した。また、HDM 投与後

の *Axl*<sup>-/-</sup>マウス気管と肺を解析することにより、2型気道炎症における *Axl* の機能を明らかにした。

## 研究目的

2型気道炎症における Ax1 の役割を明らかにすることを目的とする。

## 研究方法

### ヒト気道上皮細胞の遺伝子発現解析と患者背景

本研究では二つの独立したコホートを使用してヒト気道上皮細胞の遺伝子発現を解析した。第一のコホートは SARP により公表されている健常者と喘息患者の気道上皮擦過検体における全般的遺伝子発現データ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>; National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gene Expression Omnibus (GEO) Series accession numbers, GSE63142) である。被験者は健常者 (n = 27)、軽症・中等症喘息 (n = 72)、重症喘息 (n = 56) であり、臨床的背景は先行文献に報告されている<sup>256</sup>。喘息の重症度の定義は先行文献に従っている<sup>257</sup>。気道上皮細胞の採取、処理方法は先行文献に記載されている<sup>258</sup>。第二のコホートは Unbiased BIOMarkers in Prediction of REspiratory Disease outcomes (U-BIOPRED) Project により公表されている中等症喘息と重症喘息の気管支生検組織における全般的遺伝子発現データ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>; NCBI GEO Series accession numbers, GSE76227) である。被験者は中等症喘息 (n = 35)、重症喘息 (n = 56) である。患者背景は <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE76227> に記載されている。

### ヒト気管支組織と患者背景

気管支組織は、国立病院機構相模原病院において2005年から2015年までの間に気管支鏡検査を受けた患者より提供された。検体は、気管支鏡による観察下で第3次気管支または第3次



気管支よりも末梢の気管支から生検鉗子により把持することで生検、採取された。被験者は非喘息 (n=7)、軽症・中等症喘息 (n=7)、重症喘息 (n=10) である。喘息の重症度の定義はGINAによる2019年版の Global strategy for asthma management and prevention に従った<sup>259</sup>。

気管支生検組織の患者背景を表1に示す。なお、本邦で保険診療の利用による呼気一酸化窒素 (nitrogen monoxide: NO) の測定が可能となったのは2013年6月であるものの、喘息患者の気管支検体は全例において2005年から2010年の間に採取されているため、呼気 NO は測定されていない。非喘息における気管支鏡検査の実施理由は、咳嗽の原因精査目的が3例、胸部異常陰影の精査目的が4例 (胸部異常陰影の原因; 3例が炎症性変化、1例が肺扁平上皮癌) であった。非喘息のいずれの検体も主病変から十分に離れており、病理学的に癌組織が含まれていないことを確認した。また、非喘息の一部の検体では喫煙による軽度の炎症性変化を伴っていたものの、喘息を示唆する病理所見はいずれにおいても認めなかった。非喘息のうち1例が関節リウマチの治療目的で全身性ステロイド (プレドニゾン5 mg/日) を連日投与されていた。軽症・中等症喘息、重症喘息の全例において検体採取日までに全身性ステロイド投与を中止されていた。本研究は東北大学大学院医学系研究科 (承認番号: 2017-1-183) および相模原病院 (承認番号: 倫理2017年度-031) の倫理委員会で承認され、全ての対象者からインフォームドコンセントを得た。

## ヒト気管支生検組織の病理学的検討

### 1. 蛍光免疫染色と解析方法

気管支組織は相模原病院においてホルマリン固定後にパラフィン包埋された。東北大学病院病理部で3  $\mu\text{m}$  の厚さで切片を作成した。切片を脱パラフィン化し、抗原賦活化液 pH9 (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) に浸し121  $^{\circ}\text{C}$  で5分間オートクレーブ処理することにより抗原賦活した。切片を10%ロバ血清 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)/0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) /phosphate buffered saline (PBS) 溶液を用いて室温で30分間ブロッキングした後、以下に示す一次抗体を用いて4 $^{\circ}\text{C}$  で一晩反応させた: ヤギ抗ヒト Ax1 抗体 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA, catalogue number AF154, goat IgG; 最終濃度2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); ウサギ抗ヒト/マウス Keratin5抗体 (BioLegend, San Diego, CA, USA, catalogue number PRB-160P, clone poly 19055, rabbit IgG; 最終濃度 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。以下に示す二次抗体により室温で1時間反応させた: Alexa Fluor 647標識ロバ抗ヤギ抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA, catalogue number 705-605-003, donkey IgG; 希釈倍率1:75); Rhodamine 標識ロバ抗ウサギ抗体 (Jackson ImmunoResearch, catalogue number 711-025-152, donkey IgG; 希釈倍率1:75)。ProLong diamond antifade reagent with DAPI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて核染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡 C2si (Nikon, Tokyo, Japan)、対物レンズ plan Apo  $\lambda$  60 $\times$ oil (Nikon; Z 軸ステップ0.15  $\mu\text{m}$ ) および plan Apo  $\lambda$  40 $\times$  (Nikon; Z 軸ステップ0.6  $\mu\text{m}$ ) を用いて撮影し、NIS-Elements C (Nikon) で画像を取得した。画像を NIS-Elements AR (Nikon)

により解析した。Keratin5 (基底細胞マーカー)<sup>+</sup>基底細胞と Keratin5<sup>+</sup>Axl<sup>+</sup>基底細胞の計数においては、対物レンズ plan Apo λ 40×を用いて無作為に1-5視野を選択し、各視野の max intensity projection を取得した後、計数した細胞数を気管支の基底膜長で除することにより標準化した。Keratin5<sup>+</sup>Axl<sup>+</sup>基底細胞の計数においては、Axl の蛍光強度の強弱によらず全て等しく Axl 陽性細胞とみなし、定性的に計数した。なお、喘息患者の気道上皮において基底細胞過形成を来している部位は計数から除外した。

## 2. 好酸球染色、マスト細胞染色と解析方法

切片を脱パラフィン化し、Eosinophil-Mast Cell Stain Kit (ScyTek, Logan, UT, USA) を用いて好酸球染色、マスト細胞染色を行った。Vital New Red 溶液および Astra Blue 溶液を用いて好酸球およびマスト細胞 (異染色性細胞) を各々染色した後、hematoxylin により核染色を行った。正立顕微鏡 BX53 (OLYMPUS, Tokyo, Japan)、対物レンズ UPLFLN40X (OLYMPUS)、顕微鏡用デジタルカメラ DP71/U-TV1X-2 (OLYMPUS) を使用して撮影し、DP controller (OLYMPUS) で画像を取得した。画像は画像解析ソフトウェア ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) で解析した。対物レンズ UPLFLN40X を用いて無作為に3-11視野を選択し、気管支粘膜下組織に浸潤する好酸球とマスト細胞を計数した。計数した細胞数を気管支の基底膜長で除することにより標準化した。

## マウス

実験に用いたマウスの遺伝背景は C57BL/6J、性別はメス、週齢は8-10週である。野生型マウスは日本チャールス・リバー株式会社 (Yokohama, Japan) より購入した。Axl 遺伝子欠損マウス ( $Axl^{-/-}$ ) は Tracy Hussell 教授 (University of Manchester, United Kingdom) から C57BL/6J へ10世代以上戻し交配したものを譲渡された<sup>229</sup>。本実験の動物実験計画書 (承認番号: 2016医動-186、2018医動-186)、遺伝子組換え実験計画書 (承認番号: 2016医組換-076、2018 医組換-113) は東北大学により承認され、「東北大学における動物実験に関する指針」に従い、動物の生命倫理に十分配慮して研究を遂行した。

## 野生型および $Axl^{-/-}$ マウスの遺伝子型決定

イソフルラン (Pfizer Japan, Tokyo, Japan) 吸入麻酔下にマウスの尾を末端より約5 mm 切離し DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Tokyo, Japan) によりゲノム DNA を抽出した。TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (Takara Bio, Kusatsu, Japan) と GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) を用いて polymerase chain reaction (PCR) を行った。PCR に使用したプライマーの配列と PCR の条件は下記の通りである。

$Axl$	野生型 (forward)	5'-AGAAGGGGTTAGATGAGGAC-3'
	野生型 (reverse)	5'-GCCGAGGTATAGTCTGTCACAG-3'
	変異型 (forward)	5'-AGAAGGGGTTAGATGAGGAC-3'

変異型 (reverse) 5'-TTTGCCAAGTTCTAATTCCATC-3'

PCR 条件：94 °C 2分間を1サイクル；変性94 °C 30秒間-アニーリング63 °C 30秒間-伸  
長反応72 °C 1分間を27サイクル；72 °C 2分間を1サイクル。

PCR 産物を1.5%アガロース (Thermo Fisher Scientific) ゲル中で20-30分間電気泳動した後、  
エチジウムブロマイド (NIPPON GENE, Tokyo, Japan) 溶液に10分間浸し、Gel Doc EZ Imager  
(BIO-RAD, Hercules, CA, USA) を用いて紫外線光を当てて検出した。野生型遺伝子は368塩  
基対、変異型遺伝子は275塩基対として同定した (図2)。

## HDM の投与

コナヒョウヒダニ (*Dermatophagoides farinae*) 由来抽出物を ITEA 社より購入した (ITEA,  
Tokyo, Japan, catalogue number 10108, lot number KUK12FSG103) 。

### 1. HDM 溶液の投与方法

イソフルラン3 L/分で麻酔し、マウス1匹あたり HDM 30  $\mu$ g/ Dulbecco's Phosphate-Buffered  
Saline (DPBS; Thermo Fisher Scientific) 50  $\mu$ L を経鼻投与した。対照群には DPBS 50  $\mu$ L を経  
鼻投与した。

### 2. 投与スケジュール

初回投与日を1日目、最終投与日を15日目とし、1日または2日おきに計7回投与を行った。

16日目に気管支肺胞洗浄液の採取、または気管と肺の摘出を行った。

### マウス気管支肺胞洗浄液の解析

2.4%メデトミジン (ZENOAQ, Koriyama, Japan) /6.4%ミダゾラム (Astellas Pharma, Tokyo, Japan) /8%ブトルファノール (Meiji Seika Pharma, Tokyo, Japan) /生理食塩水200  $\mu$ L をマウス腹腔内に投与した。十分に鎮静および鎮痛が得られたことを確認した後、下大静脈を切断し安楽死させた<sup>260</sup>。気管内に内径20ゲージのサーフロー留置針を留置した。サーフロー留置針から1 mL の DPBS を肺内へ注入し吸引する操作を3回行うことにより気管支肺胞洗浄を行った。気管支肺胞洗浄液を氷上で冷却し、1200 rpm、4°C で5分間遠心した。上清を破棄し、500  $\mu$ L の DPBS で再懸濁した後、ビルケルチュルク計算盤 (Erma, Tokyo, Japan) と Trypan Blue Stain 0.4% (Thermo Fisher Scientific) を用いて細胞を計数した。懸濁液100  $\mu$ L を300 rpm で5分間、集細胞遠心装置 (サイトスピン) で遠心した後、Diff-Quik 染色を行った。正立顕微鏡 BX53、対物レンズ UPLFLN40X を用いて観察し、無作為に選んだ視野から合計200個の細胞を計数することにより細胞分画を測定した。正立顕微鏡 BX53、対物レンズ UPLFLN40X、顕微鏡用デジタルカメラ DP71/U-TV1X-2を使用して撮影し、DP controller で画像を取得した。画像は ImageJ で解析した。

## マウス気管と肺の摘出

気管と左右の肺を縦隔臓器と一塊にして摘出し、無菌的に取り分けた氷上の DPBS へ浸した。左右の肺は肺門部より鋭的に切離した。気管は実体顕微鏡 M80 (Leica, Wetzlar, Germany) による観察下で第一気管軟骨の直上と気管分岐部の直上で鋭的に切離し、気管周囲のリンパ節を含む結合組織を十分に除去した。

## マウス気管の蛍光免疫染色と解析

気管を optimal cutting temperature (OCT) compound に包埋し、ドライアイスで冷却した2-メチルブタン (Wako, Osaka, Japan) に浸して凍結させた。クリオスタットを用いて長軸方向に厚さ 10  $\mu\text{m}$  に薄切した。切片を室温で20分間乾燥させた後、 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。次に、Ax1 と Keratin5、Scgb1a1、Foxj1それぞれの二重蛍光免疫染色を行った。切片を4%パラホルムアルデヒド (Wako) に室温で30分間浸して固定した。Foxj1染色時のみ、M.O.M. Immunodetection Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA, catalogue number BMK-2202) により室温で1時間反応させることでマウス IgG をブロッキングした。10%ロバ血清/0.3% Triton X-100/PBS 溶液を用いて室温で30分間ブロッキングした後、以下に示す一次抗体を用いて $4^{\circ}\text{C}$  で一晩反応させた: ヤギ抗マウス Ax1 抗体 (R&D systems, catalogue number AF854, goat IgG; 最終濃度5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); ウサギ抗ヒト/マウス Keratin5抗体 (最終濃度 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); ウサギ抗マウス Scgb1a1 (分泌細胞マーカー) 抗体 (Merck Millipore, Burlington, MA, USA, catalogue

number 07-623, rabbit IgG; 希釈倍率1:1000); マウス抗マウス Foxj1 (線毛細胞マーカー) 抗体 (Thermo Fisher Scientific, catalogue number 14-9965-82, clone 2A5, mouse IgG1; 最終濃度1  $\mu\text{g/mL}$ )。

以下に示す二次抗体により室温で1時間反応させた: Alexa Fluor 647標識ロバ抗ヤギ抗体 (希釈倍率1:75); Rhodamine 標識ロバ抗ウサギ抗体 (希釈倍率1:75); Alexa Fluor 488標識ロバ抗マウス抗体 (Jackson ImmunoResearch, catalogue number 711-545-151, donkey IgG; 希釈倍率1:150)。

ProLong diamond antifade reagent with DAPI を用いて核染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡 C2si、対物レンズ plan Apo  $\lambda$  40 $\times$  (Z 軸ステップ0.33  $\mu\text{m}$ ) を用いて撮影し、NIS-Elements C で画像を取得した。画像を NIS- Elements AR により解析し、max intensity projection を表示した。

#### マウス気管と肺の単一細胞懸濁液作成

Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS; Thermo Fisher Scientific) 中に Collagenase A (Sigma-Aldrich, catalogue number 10103586001; 最終濃度200 Unit/mL) および Deoxyribonuclease I (Sigma-Aldrich, catalogue number DN25-100MG; 最終濃度1.5 mg/mL) を添加し酵素試薬を作成した。酵素試薬2 mL 中に気管または左肺を浸した。肺組織には27ゲージ針を用いて酵素試薬1 mL を注入した。37 $^{\circ}\text{C}$ 、100 cycle/分で60分間攪拌した後、剪刀で細切した。さらに同条件で30分間攪拌し、再度剪刀で細切した。18 ゲージ針へ5回通し、100  $\mu\text{m}$  セルストレーナー (Corning, Corning, NY, USA) で濾過した。1200 rpm、4  $^{\circ}\text{C}$  で5分間遠心し上清を破棄して、Ammonium-Chloride-Potassium Lysing Buffer (Thermo Fisher Scientific) 1 mL を添加し再懸



濁した後、室温で3分間静置し溶血反応を行った。DPBS 5 mL を加え、1200 rpm、4 °C で5分間遠心し上清を破棄して、RPMI 1640 培地 (Thermo Fisher Scientific) 中にウシ胎児血清 (Thermo Fisher Scientific; 最終濃度50 mg/mL)、ペニシリン (Thermo Fisher Scientific; 最終濃度 50 Unit/mL)、およびストレプトマイシン (Thermo Fisher Scientific; 最終濃度50  $\mu$ g/mL) を添加した培養液5 mL で再懸濁した。細胞懸濁液を70  $\mu$ m セルストレーナー (Corning) で濾過した後、1200 rpm、4 °C で5分間遠心した。培養液10 mL で再懸濁し単一細胞懸濁液を作成した。ビルケルチュルク計算盤と Trypan Blue Stain 0.4%を用いて細胞を計数した。

## マウス気管と肺の単一細胞懸濁液のフローサイトメトリー解析

### 1. 死細胞染色

気管と肺の単一細胞懸濁液を96ウェルポリプロピレンマイクロプレート (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) に、 $2-3 \times 10^5$  cells/well となるように移し2000 rpm、22 °C で2分間遠心し上清を破棄した。DPBS 130  $\mu$ L で再懸濁した後、2000 rpm、22 °C で2分間遠心し上清を破棄し細胞を洗浄した。LIVE/DEAD Fixable Zombie UV (BioLegend, catalogue number 423107; 希釈倍率1:1000) /DPBS 30  $\mu$ L で再懸濁し、22 °C で30分間、暗所で静置した。

### 2. Fc 受容体ブロッキング

死細胞染色後の細胞懸濁液に1%ウシ血清アルブミン (Wako) /DPBS 130  $\mu$ L を加え、2000

rpm、22 °C で2分間遠心し上清を破棄した。抗マウス CD16/CD32抗体 (Thermo Fisher Scientific, catalogue number 14016182, clone 93, Rat IgG2a, lambda; 最終濃度5  $\mu\text{g/mL}$ ) /1%ウシ血清アルブミン/DPBS 30  $\mu\text{L}$  で再懸濁し、4 °C で15分間、暗所で静置した。

### 3. 一次抗体染色

Fc 受容体ブロッキング後の細胞懸濁液に1%ウシ血清アルブミン/DPBS 130  $\mu\text{L}$  を加え、2000 rpm、22 °C で2分間遠心し上清を破棄した。表2に示す抗体を混合した1%ウシ血清アルブミン/DPBS で再懸濁し、4 °C で30分間、暗所で静置した。染色の陰性コントロールとして、fluorescence minus one (FMO) にアイソタイプコントロール抗体を加えた。

### 4. 蛍光標識ストレプトアビジンによるラベリング

一次抗体染色後の細胞懸濁液に1%ウシ血清アルブミン/DPBS 130  $\mu\text{L}$  を加え、2000 rpm、22 °C で2分間遠心し上清を破棄した。Allophycocyanin (APC) 標識ストレプトアビジン (BioLegend, catalogue number 405207; 最終濃度1  $\mu\text{g/mL}$ ) /1%ウシ血清アルブミン/DPBS 30  $\mu\text{L}$  で再懸濁し4 °C で30分間、暗所で静置した。

### 5. 固定

細胞懸濁液に1%ウシ血清アルブミン/DPBS 130  $\mu\text{L}$  を加え、2000 rpm、22 °C で2分間遠心し

上清を破棄した。4%パラホルムアルデヒド/DPBS 50  $\mu$ L と1%ウシ血清アルブミン/DPBS 50  $\mu$ L を加え、22 °C で30分間、暗所で静置した。1%ウシ血清アルブミン/DPBS 130  $\mu$ L を添加し、2000 rpm、22 °C で2分間遠心し上清を破棄した。1%ウシ血清アルブミン/DPBS 130  $\mu$ L で再懸濁した。

## 6. フローサイトメトリー

細胞表面抗原の発現を Fortessa (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) により検討した。CountBright Absolute Counting Beads (ThermoFisher Scientific) を用いて細胞を計数した。FlowJo version 10 (Becton Dickinson and Company) を使用して結果を解析した。

## マウス気管と肺の病理学的検討

気管と肺を10%ホルマリン (Wako) へ浸し固定しパラフィンに包埋した後、3  $\mu$ m の厚さで切片を作成した。切片を hematoxylin-eosin (HE) と periodic acid-Schiff (PAS) で染色し、炎症細胞の浸潤と杯細胞過形成を評価した。正立顕微鏡 BX53、対物レンズ UPLFLN10X (OLYMPUS)、顕微鏡用デジタルカメラ DP71/U-TV1X-2を用いて撮影し、DP controller で画像を取得した。画像は ImageJ で解析した。

## 細胞培養

### 1. 培養条件

不死化ヒト気道上皮細胞株 BEAS-2B 細胞 (52-61継代) を用いて実験を行った<sup>261</sup>。培地には Bronchial Epithelial Cell Growth Medium (BEGM) BulletKit (Lonza, Basel, Switzerland) を使用した。BEGM BulletKit にはヒドロコルチゾン (最終濃度不明)、ゲンタマイシン (最終濃度不明)、アムホテリシン B (最終濃度不明)、レチノイン酸 (最終濃度不明)、ウシ下垂体抽出物 (最終濃度不明)、トランスフェリン (最終濃度不明)、トリヨードサイロニン (最終濃度不明)、エピネフリン (最終濃度不明)、ヒト上皮細胞成長因子 (最終濃度 $0.5 \mu\text{g/mL}$ )、ヒトリコンビナントインスリン (最終濃度 $5 \text{ ng/mL}$ ) が含まれる。容器には底面積 $75 \text{ cm}^2$ のノントリートメントタイプフラスコ (Corning) または直径 $10 \text{ cm}$  の組織培養用ディッシュ (AGC TECHNO GLASS, Haibara, Japan) を用い、播種する細胞密度を $3.3 \times 10^4$ - $1.0 \times 10^5 \text{ cells/mL}$  に調整した。実験の際は、6ウェル細胞培養用プレート (Corning) または12ウェル細胞培養用プレート (Corning) を使用し、播種する細胞密度を $1.6 \times 10^4$ - $1.0 \times 10^5 \text{ cells/mL}$  に調節した。 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  インキュベーター内で培養し、細胞を播種した翌日に培地を交換した。

### 2. 細胞の回収と保存

細胞密度が70-80%である時期に細胞を回収した。培地を吸引し Trypsin/EDTA (Lonza)  $4 \text{ mL}$  を加え $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  インキュベーター内で5分間静置した。細胞が培養容器の底面から剥離

したことを倒立型顕微鏡 CKX31 (OLYMPUS) で確認し、Trypsin Neutralizing Solution (Lonza) 4 mL を添加し Trypsin/EDTA を中和した。1000 rpm、22 °C で5分間遠心した後、上清を吸引し5-10 mL の培地で再懸濁した。1000 rpm、22 °C で5分間遠心した後、CELLBANKER 2 (ZENOAQ) で $1.0 \times 10^6$  cells/mL となるように再懸濁した。クライオチューブに1 mL ずつ分注し液体窒素内で凍結保存した。

### 3. Recombinant Human Gas6 (hrGas6)、Axl 阻害剤 (R428) による刺激

6ウェル細胞培養用プレートに BEAS-2B 細胞を播種した。48時間後、hrGas6 (R&D systems, catalogue number AF854; 最終濃度 100 ng/mL) /1%ウシ血清アルブミン/DPBS 25  $\mu$ L を培養上清へ添加し、37 °C 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで15分間反応させた。R428 (Selleckchem, Houston, TX, USA, catalogue number S2841) /DMSO (Wako; 希釈倍率1:1000) を培養上清に添加し、37 °C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで3時間反応させた。R428の最終濃度は図18D に示す濃度に調整した。

### 4. HDM、Recombinant Human IL-4 (hrIL-4)、Recombinant Human IL-13 (hrIL-13)、Recombinant Human Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ (hrTNF- $\alpha$ ) による刺激

12 ウェル細胞培養用プレートに BEAS-2B 細胞を播種した。24時間後、siRNA トランスフェクションを行った。72時間後、HDM (最終濃度0.4, 4, 40  $\mu$ g/mL)、Animal-Free Recombinant

Human IL-4 (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA, catalogue number AF-200-04; 最終濃度30 ng/mL) と Animal-Free Recombinant Human IL-13 (Peprotech, catalogue number AF-200-13; 最終濃度30 ng/mL)、または Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  human, recombinant expressed in *E.coli* (Sigma-Aldrich, catalogue number T6674; 最終濃度10 ng/mL) を培養上清中に添加し、37 °C、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で図に示す時間反応させた。

### siRNA トランスフェクション

Silencer Select siRNAs for Axl (Thermo Fisher Scientific, catalogue number s1845 (siAxl #1), catalogue number s1846 (siAxl #2)) を用いて BEAS-2B 細胞の Axl をノックダウンした。特定の蛋白発現を抑制する機能を持たない non-targeting control siRNA (siNTC) には Silencer Select Negative Control No. 1 siRNA (Thermo Fisher Scientific, catalogue number 4390843) を使用した。siRNA のトランスフェクションには Lipofectamin RNAiMAX Transfection Reagent (Lipofectamin; Thermo Fisher Scientific, catalogue number 13778030) を用いた。

6ウェル細胞培養用プレートまたは12ウェル細胞培養用プレートに BEAS-2B 細胞を播種した。24時間後に培地を吸引し、ゲンタマイシンとアムホテリシン B を添加していない培地 2250  $\mu$ L (6ウェル細胞培養用プレート) または900  $\mu$ L (12 ウェル細胞培養用プレート) を添加した。15 mL のポリスチレン製コニカルチューブ (Corning) の中で Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Thermo Fisher Scientific)、Lipofectamin (最終濃度0.1%)、および siRNA (siAxl

#1、siAxl #2または siNTC) を混合し、5分間室温で静置した。siRNA の最終濃度は図の説明に示す濃度に調整した。Lipofectamine と siRNA の混合液250  $\mu$ L (6ウェル細胞培養用プレート) または100  $\mu$ L (12 ウェル細胞培養用プレート) を培地へ加えた。

## RNA 抽出と定量 PCR

RNeasy Mini kit (QIAGEN) または RNeasy Micro kit (QIAGEN)を用いて BEAS-2B 細胞の total RNA を抽出した。超微量分光光度計 NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) で total RNA の量と質を測定した。Total RNA 300-1000 ng を High Capacity RNA-to-cDNA kit (Thermo Fisher Scientific) と混合し、GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) を用いて下記の条件で逆転写反応を行った。

逆転写反応条件：アニーリング37℃ 60分間を1サイクル、伸長反応95℃ 5分間を1サイクル、4℃ で保持。

逆転写反応で得られた相補的 DNA、PCR 用プライマー (最終濃度0.5  $\mu$ M) 、および SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を混合し PCR 用96ウェルプレート (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量 PCR を行った。プライマーは Takara Bio より購入するか (*ACTB*, HA067803; *AXL*, HA268303; *GAS6*, HA032830; *CSF2*, HA126039; *IL33*, HA299316)、公表されているデータベースを利用して作成した (PrimerBank ID: *CCL5*, 22538813c1; *CCL24*, 22165426c1; *CXCL8*, 10834978a1. RTPrimerDB ID: *RPLP0*, 2507; *CCL11*, 4000; *CXCL1*, 280) <sup>262-</sup>

<sup>266</sup>。Long form of thymic stromal lymphopoietin (lfTSLP) のプライマー配列については先行研究を参照した<sup>267</sup>。リアルタイム PCR システム StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific) により 40 サイクルの PCR を行った。得られた Ct を用いて $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法により遺伝子発現量を相対定量した<sup>268</sup>。内因性コントロールを示していない全ての図の実験において、*RPLP0*を内因性コントロールとして用いた。相対定量した遺伝子の相対的発現強度を示すために、Heatmapper (<http://www.heatmapper.ca>) でヒートマップを作成した。

## BEAS-2B 細胞のフローサイトメトリー解析

6ウェル細胞培養用プレートに BEAS-2B 細胞を播種し、細胞密度が80%となるまで培養した。上清を吸引し5 mM EDTA 1 mL を各ウェルへ添加し、37 °C で10分間反応させた。細胞を回収し、1500 rpm、22 °C で5分間遠心した後、上清を破棄した。DPBS 5 mL を加え、1500 rpm、22 °C で5分間遠心した後、上清を破棄した。DPBS 200  $\mu$ L で再懸濁した。

### 1. 死細胞染色

細胞懸濁液100  $\mu$ L を96ウェルポリプロピレンマイクロプレートへ移し、2000 rpm、22 °C で2分間遠心し上清を破棄した。LIVE/DEAD Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit, for 633 or 635 nm excitation (Thermo Fisher Scientific, catalogue number L10119; 希釈倍率1:1000) /DPBS 30  $\mu$ L で再懸濁し、22 °C で30分間、暗所で静置した。



## 2. 抗体染色

細胞懸濁液に1%ウシ血清アルブミン/DPBS 130  $\mu$ L を加え、2000 rpm、22 °C で2分間遠心し上清を破棄した。Phycoerythrin (PE) 標識マウス抗ヒト Axl 抗体 (R&D systems, catalogue number FAB154P, clone 108724, mouse IgG1; 希釈倍率1:10) /1%ウシ血清アルブミン/DPBS で再懸濁し、4 °C で30分間、暗所で静置した。染色の陰性コントロールとして、アイソタイプコントロール抗体を加えた。

## 3. 固定

細胞懸濁液に1%ウシ血清アルブミン/DPBS 130  $\mu$ L を加え、2000 rpm、22 °C で2分間遠心し上清を破棄した。4%パラホルムアルデヒド/DPBS 50  $\mu$ L と1%ウシ血清アルブミン/DPBS 50  $\mu$ L を加え、22 °C で30分間、暗所で静置した。1%ウシ血清アルブミン/DPBS 130  $\mu$ L を添加し、2000 rpm、22 °C で2分間遠心し上清を破棄した。1%ウシ血清アルブミン/DPBS 130  $\mu$ L で再懸濁した。

## 4. フローサイトメトリー

細胞表面抗原の発現を Canto II (Becton Dickinson and Company) を用いて検討した。FlowJo version 10を使用して結果を解析した。

## ELISA

### 1. Total Axl、phosphorylated Axl (phospho Axl) の測定

以下に示す組成の Tris/Triton buffer を細胞溶解液として用いた: Tris-HCl p H7.5, 最終濃度50 mM; 塩化ナトリウム, 最終濃度 100 mM; EDTA, 最終濃度1 mM; EGTA, 最終濃度1 mM; Triton-X, 最終濃度1%; グリセロール (Wako), 最終濃度10%; 2-メルカプトエタノール (BIO-RAD), 最終濃度 0.1%。6ウェル細胞培養用プレート上で培養した BEAS-2B 細胞の培養上清を吸引した。DPBS 1mL を加えて吸引した後、Halt protease/phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Scientific, catalogue number 78440; 希釈倍率1:100) を混合した Tris/Triton buffer 100-150  $\mu$ L を各ウェルへ添加し、氷上で5分間静置した。ウェルの底面をセルスクレーパー (Corning) で擦過し、細胞溶解液を回収した。ボルテックスミキサーで1分間攪拌した後、14000 g、4 °C で10分間遠心した。上清を回収し、-80 °C で保存した。Total Axl、phospho Axl の測定には Human Total Axl DuoSet IC ELISA (R&D systems, catalogue number DYC1643-5)、Human Phospho-Axl DuoSet IC ELISA (R&D systems, catalogue number DYC2228-2) を各々用いた。

### 2. GM-CSF、RANTES の測定

12ウェル細胞培養用プレートに BEAS-2B 細胞を播種した。24時間後、siRNA トランスフェクションを行った。48時間後に HDM (4  $\mu$ g/mL) または PBS を上清中に添加した。24時間後に培養上清を回収し、1000 rpm、22 °C で5分間遠心し上清を回収した後、-80 °C で保存し

た。GM-CSF、RANTES の測定には Human GM-CSF Quantikine ELISA kit (R&D systems, catalogue number DGM00)、Human CCL/RANTES Quantikine ELISA kit (R&D systems, catalogue number DRN00B) を各々用いた。

## ウェスタンブロッティング

### 1. 細胞溶解液の回収

6ウェル細胞培養用プレートに BEAS-2B 細胞を播種した。24時間後、siRNA トランスフェクションを行った。72時間後に HDM (最終濃度: 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を培養上清中に添加した。0分後 (HDM 未添加)、30分後に上清を吸引し、DPBS 1mL を加えた後、6ウェル細胞培養用プレートを氷上へ静置した。上清を吸引し、10% RIPA buffer (10X) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) /1% Protease Inhibitor Cocktail for mammalian cell and tissue (Sigma-Aldrich) 120  $\mu\text{L}$  をウェルへ添加し、5分間静置した。ウェルの底面をセルスクレーパーで擦過し、細胞溶解液を回収した。ボルテックスミキサーで1分間攪拌した後、14000 g、4 $^{\circ}\text{C}$  で10分間遠心し上清を回収し、-80 $^{\circ}\text{C}$  で保存した。回収した細胞溶解液中の総蛋白濃度を Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) で測定した。

### 2. 蛋白の検出

10% 2-メルカプトエタノール/4 $\times$ Laemmli Sample Buffer (BIO-RAD) と細胞溶解液を3:1の割

合で混合しサンプル溶液を作成した。サンプル溶液を95 °C で5分間加熱した後、総蛋白量9  $\mu\text{g}$  に相当する量を Mini-PROTEAN TGX Precast Gels 12% (BIO-RAD) へ載せ、1% 10x Tris/Glycine/SDS Buffer (BIO-RAD) 中で200 V で電気泳動した。1% 10x Tris/Glycine Buffer (BIO-RAD)/20%メタノール (Wako)、Extra thick blot filter paper (BIO-RAD)、Trans-Blot Turbo Transfer System (BIO-RAD) を用いて Immobilon-P Transfer Membranes (Merck Millipore) へ転写を行った。Ax1 の検出時を除き、PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて室温で1時間ブロッキング処理を行った。Ax1 の検出時は5%スキムミルク (Wako) /TBS-T (Tris, 最終濃度5 mM; NaCl, 最終濃度13.8 mM; KCl, 最終濃度0.27 mM; polysorbate 20 (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, USA), 希釈倍率1:1000) を用いて室温で1時間ブロッキング処理を行った。メンブレンを TBS-T に浸して洗浄し、下記に示す一次抗体を使用し4 °C で一晩反応させた: マウス抗  $\beta$ -actin 抗体 (Sigma-Aldrich, catalogue number A5316, clone AC-74, mouse IgG2a; 希釈倍率1:5000)、ウサギ抗 Ax1 抗体 (Cell Signaling Technology, catalogue number 8661, rabbit IgG; 希釈倍率1:1000)、ウサギ抗 A20抗体 (Cell Signaling Technology, catalogue number A5630, rabbit IgG; 希釈倍率1:1000)、ウサギ抗 phosphorylated A20 (phospho A20) 抗体 (Cell Signaling Technology, catalogue number 63523; 希釈倍率1:1000)、ウサギ抗 nuclear factor  $\kappa$  B inhibitor (I $\kappa$ B)  $\alpha$  抗体 (Cell Signaling Technology, catalogue number 9242; 希釈倍率1:1000)。メンブレンを TBS-T に浸して洗浄し、下記に示す二次抗体を用いて室温で1時間反応させた: Horse radish peroxidase (HRP) 標識マウス IgG $\kappa$  結

合タンパク質 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA, catalogue number sc516102; 最終濃度 0.2  $\mu\text{g/mL}$ )、peroxidase 標識ロバ抗ウサギ IgG (H+L) 抗体 (Jackson ImmunoResearch, catalogue number 711-035-152; 最終濃度 0.16  $\mu\text{g/mL}$ )。Ax1 の検出時を除き、一次抗体と二次抗体の希釈液には Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution (Toyobo) を使用した。Ax1 の検出時は一次抗体希釈液には 5% ウシ血清アルブミン / 0.1% polysorbate 20 を、二次抗体希釈液には 1% スキムミルク / TBS-T を各々用いた。メンブレンを TBS-T に浸して洗浄し、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) を用いて発色反応を行い、LAS-4000 mini (Fujifilm, Tokyo, Japan) でバンドを検出、撮影した。バンドの densitometry を ImageJ で定量し、 $\beta$ -actin における densitometry を用いて標準化した後、コントロールの同一サンプルに対する比で示した。

## 統計解析

Prism 7 for Mac OS X (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)、Prism 8 for Mac OS X (GraphPad Software) を用いて統計学的解析を行った。P<0.05 をもって有意差があると定義した。統計値および使用した統計学的手法は図の説明に記載した。

## 研究結果

### 1. 喘息の気道上皮細胞における Axl 発現の検討

喘息の気道上皮細胞における Axl 発現の変化を検討するため、二つの独立したコホートを  
使用してヒト気道上皮細胞の遺伝子発現を解析した。第一のコホート解析では、SARP に  
より公表されている健常者 (n = 27)、軽症・中等症喘息 (n = 72)、重症喘息 (n = 56) の気管支  
上皮擦過検体の網羅的遺伝子発現データ (NCBI-GEO Series accession numbers, GSE63142) を  
用いて *AXL* mRNA の相対的発現量を比較した。重症喘息では健常者および軽症・中等症喘  
息と比較して気道上皮細胞における *AXL* mRNA の発現が有意に低下していた (図3A)。一  
方、Axl 以外の TAM 受容体 (*Mertk*、*Tyro3*) の mRNA の発現は重症喘息では低下していな  
かった (図3B-C)。TAM リガンドの mRNA 発現量の解析では、*Mertk* と *Tyro3* のアゴニスト  
である *PROS1* (protein S) mRNA の発現は重症喘息で低下していたものの、Axl、*Mertk*、*Tyro3*  
のアゴニストである *GAS6* mRNA の発現は健常者、軽症・中等症喘息、重症喘息の間で有意  
な変化を認めなかった (図3D-E)<sup>233</sup>。第二のコホート解析では、U-BIOPRED Project により  
公表されている中等症喘息と重症喘息の気管支生検組織における網羅的遺伝子発現データ  
(NCBI-GEO Series accession numbers, GSE76227) を用いて *AXL* mRNA の相対的発現量を比較  
した。第一のコホート解析 (図3A) と同様に、重症喘息では中等症喘息と比較して *AXL*  
mRNA の発現が有意に低下していた (図4A)。一方、Axl 以外の TAM 受容体 (*Mertk*、*Tyro3*)  
および TAM リガンド (*Gas6*、protein S) の mRNA の発現は中等症喘息、重症喘息の間で有

意な差を認めなかった (図4B-E)。次に、非喘息 (n = 7)、軽症・中等症喘息 (n = 7)、重症喘息 (n = 10) の気管支生検組織を用いて気道上皮細胞における Axl 蛋白の発現を検討した。

気管支生検組織の患者背景については、軽症・中等症喘息のうち3名 (43%)、重症喘息のうち7名 (70%) でアトピー素因を認め、 $\chi^2$ 検定で両群間に有意差は認めなかった (表1)。また、末梢血好酸球数の中央値 (四分位範囲) は非喘息で70 (50-110) / $\mu$ L、軽症・中等症喘息で350 (100-380) / $\mu$ L、重症喘息で195 (105-410) / $\mu$ L であり、Dunn の多重比較検定後の Kruskal-Wallis 検定で3群間に有意差は認めなかった (表1)。この検体を用いて、気道上皮細胞における Axl 蛋白の発現を蛍光免疫染色により評価したところ、先行研究と同様に、非喘息と軽症・中等症喘息の気道上皮細胞における Axl 発現細胞は主に Keratin5<sup>+</sup>基底細胞であった (図5A) <sup>255</sup>。

一方、重症喘息の気道上皮細胞における Axl 蛋白の発現は非喘息および軽症・中等症喘息と比較して有意に低下し (図5A-B)、網羅的遺伝子発現データ解析の結果と一致していた (図3A、図4A)。気管支生検組織の患者のうち一部は、生検目的の気管支鏡検査前に全身性ステロイドを投与されていた (表1)。全身性ステロイドはマウス骨髄由来マクロファージにおいて Axl の mRNA と蛋白の発現を低下させることが知られているため、気管支鏡検査前の全身性ステロイド投与群と非投与群の間で気道上皮細胞における Axl の発現を比較した<sup>249</sup>。

軽症・中等症喘息および重症喘息のいずれにおいても、気管支鏡検査前の全身性ステロイド投与群の Keratin5<sup>+</sup>Axl<sup>+</sup>基底細胞の割合は非投与群と比較して低下していなかった (図6)。軽症・中等症喘息および重症喘息の気道上皮細胞における Axl 発現と患者背景に関する相関

分析を行った。気道上皮細胞における Axl 発現と年齢、喫煙歴、body mass index (BMI)、血清総 IgE、末梢血好酸球数、および provocative concentration of acetylcholine that results in a 20% fall in FEV<sub>1</sub> (PC20-Ach; 1秒量を20%低下させるのに要するアセチルコリンの濃度) の間には有意な相関を認めなかった (図7A-F)。気道上皮細胞における Axl 発現と% predicted values of forced expiratory volume in 1 second (% FEV<sub>1</sub>; 予測1秒量に対する比率) の間に中等度の正の相関を認めた (図7G)。また、気道上皮細胞における Axl 発現と喫煙歴、BMI、血清総 IgE、末梢血好酸球数、PC20-Ach、% predicted values of forced vital capacity (%FVC; 予測努力肺活量に対する比率)、%FEV<sub>1</sub>の間で多変量線形回帰分析を行った結果、いずれの項目でも有意差を認めなかった (表3)。

## 2. 喘息の気道組織中に浸潤する好酸球とマスト細胞の検討

2型気道炎症は重症喘息の主な炎症病態の一つであり、2型気道炎症の主なエフェクター細胞は好酸球とマスト細胞であることが知られている<sup>27,29,94</sup>。喘息の気道上皮基底細胞における Axl 発現がステロイド抵抗性の2型気道炎症と関与しているかどうかを検討するため、喘息の気管支粘膜下組織に浸潤する好酸球とマスト細胞を病理組織学的に計数し、気管支鏡検査前の全身性ステロイド投与群と非投与群の間で比較検討した。重症喘息の全身性ステロイド非投与群では、気管支粘膜下組織に多数の好酸球が浸潤していた (図8D)。軽症・中等症喘息においては、全身性ステロイド非投与群で認められた少数の好酸球とマスト細胞



は全身性ステロイド投与群ではほぼ消失していた (図8A-B)。一方、重症喘息においては全身性ステロイド投与群においても依然として好酸球、マスト細胞が気管支粘膜下組織に浸潤していた (図8C)。加えて、全身性ステロイド投与群では気管支粘膜下組織に浸潤する好酸球数、マスト細胞数いずれも気道上皮 Axl の発現と強い負の相関を認めた (図9A、C)。これに対して、全身性ステロイド非投与群では気管支粘膜下組織に浸潤する好酸球数、マスト細胞数のいずれも気道上皮細胞における Axl の発現と相関を認めなかった (図9B、D)。

### 3. HDM 投与によるマウス2型気道炎症モデルを用いた Axl の機能解析

2型気道炎症における Axl の機能を解析するために、先行研究に従い野生型 C57BL/6マウスに HDM を経鼻投与することにより2型気道炎症モデルを作成した (図10A) <sup>269</sup>。HDM 投与後の気管支肺泡洗浄液では、好酸球優位の炎症細胞数増加を認め (図10B-C)、肺切片では気道周囲の炎症細胞浸潤と、気道上皮の杯細胞過形成を認めた (図10D)。

HDM に含まれる LPS などの炎症性刺激は Axl の蛋白発現を促進させることが知られているため、Axl 抗体と気道上皮細胞サブセットに特異的な lineage マーカー抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、HDM 投与後のマウス気管上皮の Axl 蛋白発現細胞を確認した<sup>249</sup>。HDM 投与後の気管上皮の Axl<sup>+</sup>細胞は無刺激時と同様に Keratin5<sup>+</sup>基底細胞に一致しており (図11)、Scgb1a1<sup>+</sup>分泌細胞と Foxj1<sup>+</sup>線毛細胞に Axl 蛋白の発現は認められなかった (図12、図13)。なお、HDM 投与後のマウス気管上皮では、Foxj1<sup>+</sup>線毛細胞は著明に減少していた (図13)。更

に、気管に存在する CD11c<sup>hi</sup>/MHC II<sup>hi</sup> 樹状細胞が HDM 投与後においても Axl 蛋白を発現していないことをフローサイトメトリーにより確認した (図14)。

Axl が2型気道炎症を制御しているかどうかを検討するため、野生型 C57BL/6 マウスと *Axl*<sup>-/-</sup> マウスに HDM を投与した。気管と肺を酵素処理することにより単細胞懸濁液を作成し、先行研究に従ってフローサイトメトリーにより CD45<sup>pos</sup>Lin<sup>neg</sup>SiglecF<sup>hi</sup>CD11c<sup>neg</sup> 好酸球、CD45<sup>pos</sup>Lin<sup>neg</sup>Ly6G<sup>pos</sup>CD11b<sup>hi</sup> 好中球を同定し計数した (図15A-B)<sup>255,270</sup>。対照の PBS 投与群においては、気管と肺組織に浸潤する好酸球数と好中球数は野生型 C57BL/6 マウスと *Axl*<sup>-/-</sup> マウスの間で有意な差を認めず、正常状態では Axl はリン酸化されず非機能的であるという先行研究を支持する結果であった (図16A-B)<sup>249</sup>。HDM 投与群において、肺組織に浸潤する好酸球数と好中球数は著明に増加したものの (図16B)、気管に浸潤する好酸球数と好中球数は肺で見られたほど顕著には増加しなかった (図16A)。また、HDM 投与群の肺切片では野生型 C57BL/6 マウスと *Axl*<sup>-/-</sup> マウスの両方において同程度の気道組織への炎症細胞浸潤と杯細胞過形成が認められた (図17B)。特筆すべきことに、HDM 投与群 *Axl*<sup>-/-</sup> マウスの気管に浸潤する好酸球数は対照の PBS 投与群 *Axl*<sup>-/-</sup> マウスおよび HDM 投与群野生型 C57BL/6 マウスと比較して有意に増加していた (図16A)。更に、HDM 投与群 *Axl*<sup>-/-</sup> マウスの気管切片では粘膜下組織における炎症細胞浸潤の増加、浮腫、血管新生が顕著に認められた (図17A)。一方、HDM 投与群の気管上皮の杯細胞過形成については野生型 C57BL/6 マウスと *Axl*<sup>-/-</sup> マウスの両群の間で明らかな差は認めなかった (図17A)。

#### 4. ヒト気道上皮細胞株 (BEAS-2B 細胞) を用いた気道上皮 Axl の機能解析

ヒトにおける気道上皮 Axl の機能を解析するため、不死化ヒト気道上皮細胞株である BEAS-2B 細胞を用いて実験を行った。BEAS-2B 細胞の培地にはヒドロコルチゾン (最終濃度不明) が含まれている。はじめに、BEAS-2B 細胞における *AXL* mRNA と *GAS6* mRNA の発現を定量 PCR により確認した (図18A-B; n=1、n は実験回数)。更に、BEAS-2B 細胞における AXL 蛋白の発現をフローサイトメトリーにより確認した (図18C; n=1、n は実験回数)。hrGas6と Axl 阻害剤 (R428) を用いて、phospho Axl の蛋白発現が減少するか検討した。hrGas6による刺激後、phospho Axl の蛋白発現は R428の濃度依存的に減少した (図18D; n=1、n は実験回数)。

次に、siRNA をトランスフェクションすることにより BEAS-2B 細胞の Axl をノックダウンした。対照の siNTC トランスフェクション群と比較して90%以上の *AXL* mRNA 発現ノックダウンを実現するために必要な siAxl #1の最終濃度を0.1-10 nM で検討した。siAxl #1の最終濃度2.5 nM 以上で94%の *AXL* mRNA 発現ノックダウンが可能であった (図19A-F; n=1、n は実験回数)。また、異なる2種類の siRNA (siAxl #1、siAxl #2) を最終濃度2.5 nM でトランスフェクションすることにより、94%の *AXL* mRNA 発現ノックダウン (図20A; n=3、n は実験回数)、および99%の total Axl 蛋白発現ノックダウンが実現されたことを確認した (図20B-C; n=1、n は実験回数)。これらの結果を基に、以後の siRNA の最終濃度は2.5 nM に固定した。

炎症病態において Axl によって抑制されるシグナル分子を同定するために、siRNA トランスフェクションによる Axl ノックダウン後に HDM (40  $\mu\text{g/mL}$ )、hrIL-4 (30 ng/mL) と hrIL-13 (30 ng/mL)、または hrTNF- $\alpha$  (10 ng/mL) で BEAS-2B 細胞を刺激し、気道上皮由来のサイトカイン、ケモカイン (*CSF2*、*CCL5*、*CCL11*、*CCL24*、*IL33*、*TSLP*、*CXCL8*、*CXCL1*) の相対的発現量を定量 PCR により比較した (図21A-B;  $n = 1$ ,  $n$  は実験回数)。Axl ノックダウンによって、HDM 刺激後の *CSF2* mRNA、*CCL5* mRNA の発現が上昇していた (図21B)。Axl ノックダウンによって *CSF2* mRNA、*CCL5* mRNA の発現が上昇するのに必要な HDM 濃度を 0-40  $\mu\text{g/mL}$  で検討した。Axl ノックダウンによって *CSF2* mRNA、*CCL5* mRNA 両方の発現が上昇する HDM 濃度は 4  $\mu\text{g/mL}$  以上であった (図21C-D;  $n = 1$ ,  $n$  は実験回数)。更に、HDM 4  $\mu\text{g/mL}$  刺激後の培養上清中の GM-CSF、RANTES の蛋白濃度は Axl ノックダウンによって有意に上昇していた (図21E-F;  $n = 3$ ,  $n$  は実験回数)。図3で示した SARP の気道上皮擦過検体と、図4で示した U-BIOPRED Project の気管支生検検体における *CSF2* mRNA、*CCL5* mRNA の発現を検討した。二つのコホートいずれにおいても、重症喘息では有意な *CSF2* mRNA、*CCL5* mRNA の上昇を認めなかった (図22A-B、図23A-B)。気道上皮細胞は IL-1 $\alpha$  産生によって自身の GM-CSF 産生を促進させることが知られているため、Axl ノックダウンにより HDM 刺激後に *IL1A* mRNA の発現が上昇するか検討した<sup>177</sup>。Axl ノックダウンにより HDM 刺激後の *IL1A* mRNA の発現は有意に上昇していた (図24;  $n = 1$ ,  $n$  は実験回数)。マウス骨髄由来マクロファージでは、Axl は SOCS1、SOCS3 の発現を誘導し TLR シグナルを

抑制することが知られている<sup>242</sup>。HDM 刺激後の BEAS-2B 細胞における *SOCS1* mRNA、*SOCS3* mRNA 発現は Axl ノックダウンによって低下しなかった (図25A-B; n = 1、n は実験回数)。

NF $\kappa$ B は GM-CSF、RANTES および IL-1 $\alpha$  産生の主要制御因子として知られている<sup>271-273</sup>。A20は NF $\kappa$ B の活性化後に NF $\kappa$ B のネガティブフィードバック因子として発現が誘導され、phospho A20となることで I $\kappa$ B kinase (IKK) 複合体の活性化を負に制御し、I $\kappa$ B $\alpha$  の分解を抑制し NF $\kappa$ B の活性化を阻害する<sup>274</sup>。また、マウス気道上皮細胞に発現する A20は HDM 刺激後の肺組織中の GM-CSF 産生を阻害し、2型炎症を抑制する<sup>275</sup>。したがって、私は Axl が気道上皮細胞において A20のリン酸化を促進し NF $\kappa$ B の活性化を阻害しているという仮説を立て、この仮説を検証した。HDM 刺激30分後において、BEAS-2B 細胞の phospho A20の蛋白発現は Axl ノックダウンにより有意に低下していた (図26A-B; n = 1、n は実験回数)。更に、HDM 刺激30分後において、統計学的に有意ではないものの、BEAS-2B 細胞における I $\kappa$ B $\alpha$  の蛋白発現は Axl ノックダウンにより低下する傾向を示した (図26A、C; n=1、n は実験回数)。

気道上皮細胞由来のプロテアーゼインヒビターのうち2型炎症に対して防御的に作用するものとして、SLPI、CSTA が知られている<sup>220,223</sup>。Axl が2型炎症に対して防御的に作用する気道上皮細胞由来のプロテアーゼインヒビター発現を制御しているかどうかを検討するため、Axl ノックダウン後の無刺激の BEAS-2B 細胞 における *SLPI* mRNA、*CSTA* mRNA の発現

を定量 PCR により比較した。*SLPI* mRNA、*CSTA* mRNA の発現はいずれも Axl ノックダウンにより有意に低下した (図27A-B; n=3、n は実験回数)。

## 考察

本研究の結果により得られた概念を図28に示す。本研究では、Axl が好酸球浸潤を抑制することで2型気道炎症を負に制御することを明らかにした。*In vitro* の検証によって、Axl は気道上皮細胞において HDM 刺激時に A20のリン酸化を誘導し、GM-CSF と RANTES の遺伝子発現を抑制することで、好酸球の活性化と組織への浸潤を阻害する可能性が示された。

この結果は、*in vivo* において Axl が HDM 投与後のマウス気管に浸潤する好酸球を抑制していたことに対する説明の一つとなり得る。気道上皮細胞によって産生される GM-CSF は HDM 誘導性の2型気道炎症において樹状細胞を活性化し、樹状細胞の活性化およびリンパ節への遊走を誘導することで Th2反応の増強に関与する<sup>177,183,184</sup>。更に、GM-CSF は *in vivo* において気道組織への好酸球遊走を促進させ、喘息患者の気道に存在する好酸球の生存を延長させることが知られている<sup>185</sup>。本研究において喘息の気道組織の病理学的検討によって明らかとなった、重症喘息では気道上皮 Axl の発現が有意に低下していたという結果と、全身性ステロイド投与後にも気道組織に浸潤する好酸球とマスト細胞が気道上皮 Axl の発現低下と負の相関を認めたという結果は、気道上皮 Axl の低下がステロイド抵抗性の2型気道炎症に寄与し、重症喘息の病態に関与している可能性を示唆するものである。更に、Axl が気道上皮細胞におけるプロテアーゼインヒビターの mRNA 発現を誘導することで2型炎症に対して防御的に機能している可能性が示された。

## 1. Axl による気道への好酸球浸潤の抑制

本研究では Axl が気道への好酸球浸潤を抑制していることをはじめて明らかにした。研究背景で述べた通り、気道上皮細胞はアレルゲンプロテアーゼやアレルゲン由来の PAMPs を認識することで IL-1、IL-25、IL-33、TSLP、GM-CSF などのサイトカインや、RANTES、eotaxin などのケモカインを放出する。これらの液性因子は、樹状細胞の活性化による Th2 反応の増強に加え、ILC2 を活性化することで、エフェクター細胞である好酸球やマスト細胞を活性化し気道組織へ遊走させる<sup>276</sup>。しかしながら、気道上皮細胞によって惹起される2型気道炎症がどのように抑制されているかについては、未だに不明な点が多い。近年、貪食機能を促進するシグナル分子である Rac1 が、気道上皮細胞の貪食機能を促進することで2型気道炎症を制御することが報告された<sup>277</sup>。また、ユビキチンの修飾により NFκB 経路を抑制する A20 が、環境中から肺内へ吸入されたエンドトキシンによって誘導され、GM-CSF の産生を阻害することで樹状細胞の活性化を抑制し、2型気道炎症を負に制御することが知られている<sup>274,275,278</sup>。更に最近、ILC2 および Th2 細胞によって産生することが知られている IL-13 刺激によって気道上皮細胞がレチノイン酸を産生することで、ILC2 を IL-10 産生性の抑制性のサブセットへ変化させることが報告された<sup>38,279-281</sup>。2型気道炎症と TAM 受容体の関わりにおいては、CD4<sup>+</sup>T 細胞によって産生される protein S によって活性化した樹状細胞の Tyro3 が、樹状細胞によって産生される RANTES などのケモカイン産生を抑制することでマウス肺における2型炎症を抑制することが知られている<sup>254</sup>。また、*Axl*<sup>-/-</sup>*Mertk*<sup>-/-</sup>マウスを用いた検証に



より、Axl と Mertk は IL-4 と IL-13 と アポトーシス細胞の存在下において、寄生虫感染後に肺胞マクロファージによって誘導される細胞増殖と組織修復に寄与することが明らかとなっている<sup>246</sup>。Axl は、ヒトとマウスにおいて肺胞マクロファージに発現することが知られており、喘息患者の肺胞マクロファージでは健常者と比較して Axl の発現が低下し、マクロファージの efferocytosis 機能の低下に関連する可能性が報告されている<sup>228,253</sup>。近年、私は Axl がヒト気管支上皮基底細胞とマウス気管上皮基底細胞に発現することを報告し、マウスモデルを用いて Axl がインフルエンザウイルス感染後の気道上皮の細胞増殖と修復に関与していることを報告した<sup>255,282</sup>。しかしながら、2型気道炎症における Axl の役割を遺伝子レベルの改変による機能解析によって直接示した報告はこれまで存在しなかった。先行研究では、Axl の中和抗体をマウス腹腔内へ投与することで2型気道炎症が抑制されることが示されている<sup>283</sup>。Axl の中和抗体は Gas6 の TAM 受容体への結合を阻害するものの、*in vivo* の正常状態において Gas6 は常に TAM 受容体に結合していることが知られている<sup>249,284</sup>。このため、中和抗体によって Axl の活性化がどの程度抑制されるかは不明である。更に、Axl は血清中に可溶性受容体としても存在し、血清中の Gas6 はほぼ全てが Axl の可溶性受容体に結合している<sup>285</sup>。したがって、Axl 中和抗体が Axl 可溶性受容体にどの程度結合し Gas6 の Axl 受容体への結合に影響を与えるかについても不明である。よって、本研究によって行なった *Axl*<sup>-/-</sup>マウスや siRNA による Axl ノックダウンなどの遺伝子レベルの操作による機能喪失実験は、中和抗体による機能喪失実験と比較しより堅実な検証方法であると考える。本研究で

は HDM 投与後の野生型 C57BL/6マウス気管では有意な好酸球数の上昇を認めなかったのに対して、*Axl*<sup>-/-</sup>マウス気管では有意な好酸球の浸潤が認められた。これは、*Axl* がマウス気管において強力に好酸球の浸潤を抑制していることを示すものである。更に、HDM 投与後の *Axl*<sup>-/-</sup>マウス気管では粘膜下組織の血管新生と浮腫を認めた。マウスと異なり下気道で *Axl* の発現が認められるヒトでは、気道上皮の *Axl* 発現が低下することにより、末梢気道の好酸球増加および粘膜下組織の血管新生と浮腫が増悪し、喘息の増悪や、リモデリングの進行による呼吸機能の低下が誘導される可能性が示唆される。

## 2. *Axl* による気道上皮細胞における GM-CSF、RANTES の遺伝子発現抑制

本研究では、BEAS-2B 細胞を使用して、*Axl* が HDM 刺激によって誘導される GM-CSF、RANTES の遺伝子発現を抑制していることを明らかにした。今回の BEAS-2B 細胞を用いた実験系では、*Axl* と *Gas6* はいずれも正常状態で BEAS-2B 細胞に発現し、*Gas6* はオートクラインにより供給され、培養上清中のアポトーシス細胞によって *Axl* がリン酸化され活性化されていると考えられた<sup>233</sup>。*Axl* による炎症抑制機序は、これまでにマウス樹状細胞における *SOCS1*、*SOCS3* を介した TLR シグナルと IFNAR シグナルの抑制しか明らかにされていなかった<sup>242</sup>。HDM 刺激後の BEAS-2B 細胞における *SOCS1* mRNA、*SOCS3* mRNA 発現は *Axl* ノックダウンによって低下しなかったことから、気道上皮細胞における *Axl* の炎症抑制シグナルは未知の機序によるものであると考えられた。*Axl* ノックダウンによって GM-CSF、

RANTES、IL-1 $\alpha$  を含む複数のサイトカイン、ケモカインの発現が上昇したことから、これらのサイトカイン、ケモカインを統括して制御する調節因子が存在すると考えられた。本研究では、この調節因子が NF $\kappa$ B であるという仮説に基づき、*in vitro* の検証によって Axl が A20 のリン酸化を介して NF $\kappa$ B の活性化を抑制している可能性を示した。更に、Axl によるサイトカイン、ケモカインの発現抑制は正常状態では機能せず、HDM による刺激後にはじめて機能的となることが明らかとなった。したがって、Axl は周囲の環境依存的に機能し炎症抑制に寄与する分子であると考えられる。Axl は、マウスのインフルエンザモデルにおいて肺胞マクロファージによる efferocytosis 誘導を介した炎症収束の促進と、樹状細胞の活性化による抗ウイルス獲得免疫の誘導による1型炎症抑制においても重要である<sup>226,228</sup>。インフルエンザによって惹起される炎症は IFNAR を介した系であるため、TLR4や PAR などの PRR を介して炎症が惹起される HDM による炎症とは抑制の形式が異なるものと考えられる。更に、IL-4と IL-13による共刺激後においても、気道上皮細胞が産生するサイトカイン、ケモカインは Axl ノックダウンによって増強されなかったことから、STAT6を介した IL-4、IL-13による気道上皮の炎症シグナルに関しても、Axl によるものとは異なる炎症抑制機序が関与していると考えられる<sup>286-289</sup>。

### 3. 重症喘息の気道上皮細胞における Axl の発現低下とステロイド抵抗性の2型気道炎症

本研究では、重症喘息において気道上皮細胞における Axl の発現低下がステロイド抵抗性

の2型気道炎症に関与している可能性を示した。重症喘息の気道上皮の網羅的遺伝子解析と気管支組織の病理組織学的解析により、重症喘息では非喘息および軽症・中等症喘息と比較して有意に気道上皮細胞における Axl の発現が低下していた。なお、Keratin5<sup>+</sup>Axl<sup>+</sup>基底細胞の計数においては、Axl の蛍光強度の強弱によらず全て等しく Axl<sup>+</sup>基底細胞とみなした。このため、図5A の画像から得られる重症喘息における Axl の発現低下のイメージと図5B のグラフから得られる重症喘息における Keratin5<sup>+</sup>Axl<sup>+</sup>基底細胞/ Keratin5<sup>+</sup>基底細胞の低下のイメージには乖離が認められた。全身性ステロイド投与後においても気道組織に残存しているステロイド抵抗性の好酸球とマスト細胞の数は、気道上皮細胞における Axl の発現低下と強い負の相関を認めた。GM-CSF はステロイドによる好酸球のアポトーシス誘導を阻害し生存を延長させる<sup>290,291</sup>。また、GM-CSF や RANTES の発現亢進は喘息の重症化と関連することが報告されている<sup>292,293</sup>。培地内のステロイドの存在下においても、Axl は A20 のリン酸化を誘導し NFκB の活性化を阻害することにより、GM-CSF と RANTES の発現を抑制している可能性が示唆された。したがって、本研究で明らかとなった気道上皮細胞における Axl の発現低下による GM-CSF と RANTES の発現上昇は、重症喘息におけるステロイド抵抗性に関与している可能性がある (図29)。

#### 4. 本研究の限界と今後の課題

本研究の限界として、以下の点が挙げられる。第一に、気管支生検組織を検討した症例数

が少ない点である。この点を補うために、本研究ではより症例数の多い二つの独立したコホートを解析することによって、喘息の気道上皮における *AXL* mRNA の発現が低下していることを確認した。また、喘息の気管支生検組織において、*Axl* の蛋白発現が、ステロイド抵抗性に関連すると報告されている  $\text{GR}\alpha$ 、 $\text{GR}\beta$ 、IL-10 の発現に相関しているかどうかは今後の研究課題である。更に、今回入手した気管支生検組織ではリモデリングの十分な評価が困難であったため、今後は剖検検体やマウスモデルを用いて検討が必要と考える。また、気道リモデリングはアレルゲンをより長期に投与した慢性曝露モデルで顕著になることが知られているため、そのようなモデルを用いて今後評価していく必要がある。リモデリングの評価に関連して、マウスの呼吸機能検査を行う際は気管内挿管を行う必要があるため、本研究では *Axl*<sup>-/-</sup> マウス気管で認められた好酸球浸潤増加や血管新生と浮腫が呼吸機能に及ぼす影響を定量することが困難であった。また、喘息患者の気道上皮 *Axl* の発現と呼吸機能の関連については、%FEV<sub>1</sub> と正の相関を認めたものの、多変量線形回帰分析では有意差を認めなかったため、症例数を増やしてより詳細に検討することを今後の研究課題としたい。第二に、*in vivo* による検証では *Axl* のグローバルノックアウトマウスを使用したことである。*Axl* は肺胞マクロファージの他に線維芽細胞、血管内皮細胞にも発現することが知られている<sup>228,282,294</sup>。本研究では HDM 投与後の気管に存在する血球系細胞をフローサイトメトリーにより解析し、CD11c<sup>hi</sup>/MHCII<sup>hi</sup> 樹状細胞を含む血球系細胞に *Axl* が発現していないことを示した。なお、PBS 投与後の *Axl*<sup>-/-</sup> マウス気管の好中球のヒストグラムにおいて複数のピーク

がみられる原因は、好中球の自家蛍光の強度分布が不均一であることに起因する可能性が考えられる (図14)。また、HDM 投与後の *Axl*<sup>-/-</sup>マウス肺組織に浸潤する好酸球数は野生型マウスと比較して有意な差を認めなかったことから、肺胞マクロファージに発現する *Axl* は HDM 投与後の好酸球炎症抑制には寄与していないことが示唆される。気道上皮 *Axl* が2型炎症を制御することをより明確に示すためには、*Axl*<sup>-/-</sup>マウスの基底細胞の機能解析を行う必要がある。このため本研究では、マウス気管の基底細胞をソーティングすることで機能解析を試みたが、回収できた基底細胞数はマウス5匹分の気管を蓄積しても1000~2000個程度と少なく、通常の定量 PCR では目標の遺伝子産物の定量を行うことが困難であった。今後は、一細胞 RNA 解析や RNA の増幅による遺伝子発現解析に加え、コンディショナルノックアウトマウスを用いた実験などにより気道上皮基底細胞に特異的な *Axl* の機能解析を行う必要があると考える。第三に、*in vitro* における検証においては単一の気道上皮細胞株しか使用していないことである。また、HDM 刺激により BEAS-2B 細胞の *IL-33* mRNA 発現が上昇しなかったため、BEAS-2B 細胞が正常のヒト気道上皮細胞とは異なる反応性を示している可能性を排除できない。なお、HDM 刺激により *IL33* mRNA の発現が上昇しなかったことは、コナヒョウヒダニ由来プロテアーゼの *Der f3*が気道上皮細胞の *IL33* mRNA 発現を上昇させなかったという先行研究と合致する結果であった (図21B)<sup>180</sup>。今後は、喘息患者の気道上皮細胞由来の初代培養細胞を用いて機能解析を行うことで、喘息の気道上皮細胞における *Axl* のより詳細な機能が明らかになることが期待される。第四に、*Axl* のノックダ

ウンによる気道上皮の GM-CSF、RANTES の産生増加、NFκB の活性化、および気道上皮由来プロテアーゼの産生低下に関して、*in vivo* または *ex vivo* における検証を行っていないことが挙げられる。今後は、マウスを用いた GM-CSF、RANTES の機能喪失実験や、NFκB の阻害による GM-CSF、RANTES 発現変化の検証、複数のプロテアーゼを用いた2型気道炎症誘導の確認、マウス気管由来上皮細胞の air-liquid interface を用いた解析などが必要である。更に、本研究では A20 とプロテアーゼインヒビターに関する実験を行っていない。検索し得た範囲内では、A20 がプロテアーゼインヒビターの遺伝子発現を制御するという報告はない。一方、*in vitro* における SLPI の遺伝子発現は、CREB-binding protein によるヒストンのアセチル化を経て誘導される<sup>112</sup>。また、CREB-binding protein は NFκB によっても活性化される<sup>112</sup>。このため、CREB-binding protein を介した SLPI の遺伝子発現が、phospho A20 を介した NFκB の抑制と関連しているかどうかは今後の検討課題である。更に、*in vitro* において SLPI は IκBα 分解を阻害し NFκB の活性化を抑制する<sup>295</sup>。したがって、SLPI が A20 の発現およびリン酸化の促進を介して IκBα 分解を阻害するかどうかについても今後の研究課題としたい。

第五に、本研究では、喘息の重症化の過程で気道上皮細胞における Axl の発現が低下する可能性を示したものの、その詳細な機序が未解明であることが挙げられる。これまでに、Axl の発現抑制因子はヒト末梢血樹状細胞、腎細胞癌細胞株における microRNA-34a、マウス骨髄由来樹状細胞におけるデキサメサゾン、CpG、single-stranded RNA などが報告されている<sup>249,296,297</sup>。本研究では、*in vivo* のヒト気管支上皮において全身性ステロイド投与は Axl 蛋白

の発現を抑制しないことが示唆された (図6)。これまで、気道上皮細胞を用いて Axl の発現変動を示した報告はなく、今後の研究課題と考える。喘息の重症化の過程で気道上皮細胞における Axl の発現が低下する機序を解明することで、喘息の重症化を予防するための新たな治療戦略の発見に繋がることが期待される。

本研究は、Axl 受容体チロシンキナーゼが気道組織への好酸球浸潤を抑制し、重症喘息におけるステロイド抵抗性の2型気道炎症に関与している可能性があることを示した。本研究を進展させることにより、重症喘息の更に詳細な病態が解明され、新規治療法の開発が進展することが期待される。



## 結論

2型気道炎症において、Axl は好酸球浸潤を抑制している。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、研究の機会を与えて頂き、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました呼吸器内科学分野の一ノ瀬正和教授に深く感謝申し上げます。研究のご指導を頂きました杉浦久敏先生、山田充啓先生に厚く御礼申し上げます。直接指導して下さった藤野直也先生に心より感謝申し上げます。

気管支生検組織のご提供ならびに患者背景、病理学的所見についてご教示頂きました国立病院機構相模原病院の谷口正実先生、上出庸介先生、齋藤生朗先生に心より感謝申し上げます。

実験の技術面での助言と支援をして下さった、沼倉忠久先生、突田容子先生、奥友洸二先生をはじめとする呼吸器内科学分野の先生に深く感謝申し上げます。実験手技の助言を頂きました呼吸器内科学分野技術補佐員の高橋充さんに厚く御礼申し上げます。

動物を飼育管理して頂きました動物実験施設の方々に感謝申し上げます。

病理標本の作成にご協力頂きました東北大学病院病理部の方々ならびに実験動物病理プラットフォームの方々に御礼申し上げます。

東北大学病院共同実験室のスタッフの方々に感謝申し上げます。

貴重な研究材料を提供して下さった対象者様とそのご家族に深い感謝の意を表します。

本研究を支えて頂いた東北大学呼吸器内科学分野の先生方には大変お世話になりました。心より厚く御礼申し上げます。

## 引用文献

1. 「喘息予防・管理ガイドライン2018」作成委員. 喘息予防・管理ガイドライン  
2018. 一般社団法人日本アレルギー学会喘息ガイドライン専門部会 (監修), 協和企  
画, 東京, 2018.
2. To T, Stanojevic S, Moores G, et al. Global asthma prevalence in adults: findings from the  
cross-sectional world health survey. *BMC Public Health* 2012;12:204.
3. Fukutomi Y, Nakamura H, Kobayashi F, et al. Nationwide cross-sectional population-based  
study on the prevalences of asthma and asthma symptoms among Japanese adults. *Int Arch  
Allergy Immunol* 2010;153:280–287.
4. Chastek B, Korrer S, Nagar SP, et al. Economic Burden of Illness Among Patients with  
Severe Asthma in a Managed Care Setting. *J Manag Care Spec Pharm* 2016;22:848–861.
5. Nakazawa T, Dobashi K. Current asthma deaths among adults in Japan. *Allergology  
International* 2004;53:205–209.
6. Ekici A, Ekici M, Kara T, et al. Negative mood and quality of life in patients with asthma.  
*Qual Life Res* 2006;15:49–56.
7. Uchmanowicz B, Panaszek B, Uchmanowicz I, et al. Clinical factors affecting quality of life

- of patients with asthma. *Patient Prefer Adherence* 2016;10:579–11.
8. Shaw DE, Sousa AR, Fowler SJ, et al. Clinical and inflammatory characteristics of the European U-BIOPRED adult severe asthma cohort. *Eur Respir J* 2015;46:1308–1321.
  9. Rice JB, White AG, Scarpati LM, et al. Long-term systemic corticosteroid exposure: A systematic literature review. *Clin Ther* 2017;39:2216–2229.
  10. Corrigan CJ, Brown PH, Barnes NC, et al. Glucocorticoid resistance in chronic asthma. Glucocorticoid pharmacokinetics, glucocorticoid receptor characteristics, and inhibition of peripheral blood T cell proliferation by glucocorticoids *in vitro*. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:1016–1025.
  11. Serra-Batlles J, Plaza V, Morejón E, et al. Costs of asthma according to the degree of severity. *Eur Respir J* 1998;12:1322–1326.
  12. Kerkhof M, Tran TN, Soriano JB, et al. Healthcare resource use and costs of severe, uncontrolled eosinophilic asthma in the UK general population. *Thorax* 2018;73:116–124.
  13. Sadatsafavi M, Lynd L, Marra C, et al. Direct health care costs associated with asthma in British Columbia. *Can Respir J* 2010;17: 4–80.
  14. Johansson SG. Raised levels of a new immunoglobulin class (IgND) in asthma. *Lancet*

1967;2:951–953.

15. Bennich HH, Ishizaka K, Johansson SG, et al. Immunoglobulin E, a new class of human immunoglobulin. *Bull World Health Organ* 1968;38:151–152.
16. Barnes PJ. Targeting cytokines to treat asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol* 2018;18:454–466.
17. Wang YH, Angkasekwinai P, Lu N, et al. IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. *J Exp Med* 2007;204:1837–1847 .
18. Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell–mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 2002;3:673–680.
19. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 2005;23:479–490.
20. Sayama K, Diehn M, Matsuda K, et al. Transcriptional response of human mast cells stimulated via the Fc(epsilon)RI and identification of mast cells as a source of IL-11. *BMC Immunol* 2002;3:5.

21. Pène J, Rousset F, Brière F, et al. IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:6880–6884.
22. Kopf M, Brombacher F, Hodgkin PD, et al. IL-5-deficient mice have a developmental defect in CD5<sup>+</sup> B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses. *Immunity* 1996;4:15–24.
23. Bergeron C, Tulic MK, Hamid Q. Airway remodelling in asthma: from benchside to clinical practice. *Can Respir J* 2010;17:e85–93.
24. Lee CG, Link H, Baluk P, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung. *Nat Med* 2004;10:1095–1103.
25. Kabata H, Moro K, Fukunaga K, et al. Thymic stromal lymphopoietin induces corticosteroid resistance in natural helper cells during airway inflammation. *Nat Commun* 2013;4:2675.
26. Huang Y, Guo L, Qiu J, et al. IL-25-responsive, lineage-negative KLRG1<sup>hi</sup> cells are multipotential “inflammatory” type 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol* 2014;16:161–169.
27. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, et al. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med*

1990;323:1033–1039.

28. Lacoste JY, Bousquet J, Chanez P, et al. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92:537–548.
29. Vignola AM, Chanez P, Campbell AM, et al. Airway inflammation in mild intermittent and in persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:403–409.
30. Ricciardolo FLM, Sorbello V, Folino A, et al. Identification of IL-17F/frequent exacerbator endotype in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2017;140:395–406.
31. Weller PF, Rand TH, Goelz SE, et al. Human eosinophil adherence to vascular endothelium mediated by binding to vascular cell adhesion molecule 1 and endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7430–7433.
32. Nakajima H. Role of vascular cell adhesion molecule 1/very late activation antigen 4 and intercellular adhesion molecule 1/lymphocyte function-associated antigen 1 interactions in antigen-induced eosinophil and T cell recruitment into the tissue. *J Exp Med* 1994;179:1145–1154.
33. Nobs SP, Kayhan M, Kopf M. GM-CSF intrinsically controls eosinophil accumulation in the

- setting of allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2019;143:1513–1524.
34. Teran LM, Noso N, Carroll M, et al. Eosinophil recruitment following allergen challenge is associated with the release of the chemokine RANTES into asthmatic airways. *J Immunol* 1996;157:1806–1812.
35. Alam R, Stafford S, Forsythe P, et al. RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. *J Immunol* 1993;150:3442–3448.
36. Garcia-Zepeda EA, Rothenberg ME, Ownbey RT, et al. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nat Med* 1996;2:449–456.
37. Lopez AF, Sanderson CJ, Gamble JR, et al. Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. *J Exp Med* 1988;167:219–224.
38. Moro K, Yamada T, Tanabe M, et al. Innate production of TH2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> lymphoid cells. *Nature* 2010;463:540–544.
39. Cohn L, Homer RJ, Marinov A, et al. Induction of airway mucus production by T helper 2 (Th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. *J Exp Med* 1997;186:1737–1747.



40. Barker RL, Gleich GJ, Pease LR. Acidic precursor revealed in human eosinophil granule major basic protein cDNA. *J Exp Med* 1988;168:1493–1498.
41. Gleich GJ, Loegering DA, Bell MP, et al. Biochemical and functional similarities between human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein: homology with ribonuclease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:3146–3150.
42. Ten RM, Pease LR, McKean DJ, et al. Molecular cloning of the human eosinophil peroxidase. Evidence for the existence of a peroxidase multigene family. *J Exp Med* 1989;169:1757–1769.
43. Ueki S, Melo RCN, Ghiran I, et al. Eosinophil extracellular DNA trap cell death mediates lytic release of free secretion-competent eosinophil granules in humans. *Blood* 2013;121:2074–2083.
44. Neves JS, Perez SAC, Spencer LA, et al. Eosinophil granules function extracellularly as receptor-mediated secretory organelles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:18478–18483.
45. Brottman GM, Regelmann WE, Slungaard A, et al. Effect of eosinophil peroxidase on airway epithelial permeability in the guinea pig. *Pediatr Pulmonol* 1996;21:159–166.
46. Gleich GJ, Frigas E, Loegering DA, et al. Cytotoxic properties of the eosinophil major basic

- protein. *J Immunol* 1979;123:2925–2927.
47. Hernnäs J, Särnstrand B, Lindroth P, et al. Eosinophil cationic protein alters proteoglycan metabolism in human lung fibroblast cultures. *Eur J Cell Biol* 1992;59:352–363.
  48. Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:388–395.
  49. Ishizaka T, Ishizaka K, Tomioka H. Release of histamine and slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) by IgE-anti-IgE reactions on monkey mast cells. *J Immunol* 1972;108:513–520.
  50. Metcalfe D, Boyce JA. Mast cell biology in evolution. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:1227–1229.
  51. Abraham SN, St John AL. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol* 2010;10:440–452.
  52. Ishizaka T, Ishizaka K, Orange RP, et al. The capacity of human immunoglobulin E to mediate the release of histamine and slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) from monkey lung. *J Immunol* 1970;104:335–343.
  53. Keown MB, Henry AJ, Ghirlando R, et al. Participation of the N-terminal region of

- Cepsilon3 in the binding of human IgE to its high-affinity receptor FcεRI. *Biochemistry* 1998;37:8863–8869.
54. Schwartz LB, Lewis RA, Austen KF. Tryptase from human pulmonary mast cells. Purification and characterization. *J Biol Chem* 1981;256:11939–11943.
55. Lewis RA, Soter NA, Diamond PT, et al. Prostaglandin D2 generation after activation of rat and human mast cells with anti-IgE. *J Immunol* 1982;129:1627–1631.
56. Malaviya R, Abraham SN. Role of mast cell leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis. *J Leukoc Biol* 2000;67:841–846.
57. Dvorak AM, Costa JJ, Morgan ES, et al. Diamine oxidase-gold ultrastructural localization of histamine in human skin biopsies containing mast cells stimulated to degranulate in vivo by exposure to recombinant human stem cell factor. *Blood* 1997;90:2893–2900.
58. Brown JK, Tyler CL, Jones CA, et al. Tryptase, the dominant secretory granular protein in human mast cells, is a potent mitogen for cultured dog tracheal smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13:227–236.
59. Tsai M, Galli SJ. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med* 2012;18:693–704.
60. Wodnar-Filipowicz A, Heusser CH, Moroni C. Production of the haemopoietic growth

- factors GM-CSF and interleukin-3 by mast cells in response to IgE receptor-mediated activation. *Nature* 1989;339:150–152.
61. Plaut M, Pierce JH, Watson CJ, et al. Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc epsilon RI or to calcium ionophores. *Nature* 1989;339:64–67.
62. Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005;6:135–142.
63. Wang S-W, Oh CK, Cho SH, et al. Amphiregulin expression in human mast cells and its effect on the primary human lung fibroblasts. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:287–294.
64. Okumura S, Sagara H, Fukuda T, et al. FcεRI-mediated amphiregulin production by human mast cells increases mucin gene expression in epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:272–279.
65. Asakura T, Ishii Y, Chibana K, et al. Leukotriene D4 stimulates collagen production from myofibroblasts transformed by TGF-β. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:310–315.
66. Yu M. Mast cells can promote the development of multiple features of chronic asthma in mice. *J Clin Invest* 2006;116:1633–1641.
67. Koshino T, Teshima S, Fukushima N, et al. Identification of basophils by

- immunohistochemistry in the airways of post-mortem cases of fatal asthma. *Clin Exp Allergy* 1993;23:919–925.
68. Carroll NG, Mutavdzic S, James AL. Distribution and degranulation of airway mast cells in normal and asthmatic subjects. *Eur Respir J* 2002;19:879–885.
69. Brightling CE, Bradding P, Symon FA, et al. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med* 2002;346:1699–1705.
70. Sawant KV, Poluri KM, Dutta AK, et al. Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions. *Sci Rep* 2016;6:33123.
71. Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 1989;84:1045–1049.
72. Fujisawa T, Kato Y, Atsuta J, et al. Chemokine production by the BEAS-2B human bronchial epithelial cells: Differential regulation of eotaxin, IL-8, and RANTES by TH2- and TH1-derived cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:126–133.
73. Inoue H, Massion PP, Ueki IF, et al. Pseudomonas stimulates interleukin-8 mRNA expression selectively in airway epithelium, in gland ducts, and in recruited neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;11:651–663.

74. Massion PP, Hébert CA, Leong S, et al. Staphylococcus aureus stimulates neutrophil recruitment by stimulating interleukin-8 production in dog trachea. *Am J Physiol* 1995;268:L85–94.
75. Honda K, Wada H, Nakamura M, et al. IL-17A synergistically stimulates TNF- $\alpha$ -induced IL-8 production in human airway epithelial cells: A potential role in amplifying airway inflammation. *Exp Lung Res* 2016;42:205–216.
76. Ong CWM, Elkington PT, Brilha S, et al. Neutrophil-derived MMP-8 drives AMPK-dependent matrix destruction in human pulmonary tuberculosis. *PLoS Pathog* 2015;11:e1004917–21.
77. Belaaouaj A, McCarthy R, Baumann M, et al. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat Med* 1998;4:615–618.
78. Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, et al. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sup>+</sup> flux. *Nature* 2002;416:291–297.
79. Afonso PV, Janka-Junttila M, Lee YJ, et al. LTB<sub>4</sub> is a signal-relay molecule during neutrophil chemotaxis. *Dev Cell* 2012;22:1079–1091.
80. Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The production by

- leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 1973;52:741–744.
81. Walsh DE, Greene CM, Carroll TP, et al. Interleukin-8 up-regulation by neutrophil elastase is mediated by MyD88/IRAK/TRAF-6 in human bronchial epithelium. *J Biol Chem* 2001;276:35494–35499.
82. Kikuchi I, Kikuchi S, Kobayashi T, et al. Eosinophil trans-basement membrane migration induced by interleukin-8 and neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;34:760–765.
83. Wang S-Z, Wraith A, Bowden JJ, et al. Neutrophils induce damage to respiratory epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. *Eur Respir J* 1998;12:612–618.
84. Toussaint M, Jackson DJ, Swieboda D, et al. Host DNA released by NETosis promotes rhinovirus-induced type-2 allergic asthma exacerbation. *Nat Med* 2017;23:681–691.
85. Polak D, Hafner C, Briza P, et al. A novel role for neutrophils in IgE-mediated allergy: Evidence for antigen presentation in late-phase reactions. *J Allergy Clin Immunol* 2019;143:1143–1152.
86. Strickland I, Kisich K, Hauk PJ, et al. High constitutive glucocorticoid receptor  $\beta$  in human neutrophils enables them to reduce their spontaneous rate of cell death in response to corticosteroids. *J Exp Med* 2001;193:585–593.

87. Moore WC, Hastie AT, Li X, et al. Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:1557–1563.
88. Ordoñez CL, Shaughnessy TE, Matthay MA, et al. Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma: Clinical and biologic significance. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1185–1190.
89. Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med* 2012;18:716–725.
90. Kaur R, Chupp G. Phenotypes and endotypes of adult asthma: Moving toward precision medicine. *J Allergy Clin Immunol* 2019;144:1–12.
91. Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, et al. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:218–224.
92. Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, et al. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:315–323.
93. Opina MT, Moore WC. Phenotype-driven therapeutics in severe asthma. *Curr Allergy*



*Asthma Rep* 2017;17:10.

94. Muraro A, Lemanske RF Jr, Hellings PW, et al. Precision medicine in patients with allergic diseases: Airway diseases and atopic dermatitis-PRACTALL document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137:1347–1358.
95. Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G, et al. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *BMJ* 1995;310:1225–1229.
96. Wark PA, Johnston SL, Moric I, et al. Neutrophil degranulation and cell lysis is associated with clinical severity in virus-induced asthma. *Eur Respir J* 2002;19:68–75
97. Nicholson KG, Kent J, Ireland DC. Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *BMJ* 1993;307:982–986.
98. Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, et al. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N Engl J Med* 2005;352:1749–1759.
99. Wark PAB, Johnston SL, Bucchieri F, et al. Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. *J Exp Med* 2005;201:937–947.

100. Baraldo S, Contoli M, Bazzan E, et al. Deficient antiviral immune responses in childhood: Distinct roles of atopy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:1307–1314.
101. Pauwels RA, Busse WW, O'Byrne PM, et al. The inhaled Steroid Treatment as Regular Therapy in early asthma (START) study: rationale and design. *Control Clin Trials* 2001;22:405–419.
102. Bateman ED, Buhl R, O'Byrne PM, et al. Development and validation of a novel risk score for asthma exacerbations: The risk score for exacerbations. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:1457–1464.
103. O'Byrne PM, Pedersen S, Lamm CJ, et al. Severe exacerbations and decline in lung function in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:19–24.
104. Sin DD, Man J, Sharpe H, et al. Pharmacological management to reduce exacerbations in adults with asthma: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2004;292:367–376.
105. Jayaram L. Determining asthma treatment by monitoring sputum cell counts: effect on exacerbations. *Eur Respir J* 2006;27:483–494.
106. Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, et al. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 1985;318:635–641.

107. Bamberger CM, Bamberger AM, de Castro M, et al. Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J Clin Invest* 1995;95:2435–2441.
108. Scherrer LC, Dalman FC, Massa E, et al. Structural and functional reconstitution of the glucocorticoid receptor-hsp90 complex. *J Biol Chem* 1990;265:21397–21400.
109. Oakley RH, Jewell CM, Yudit MR, et al. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor  $\beta$  isoform. Specificity and mechanisms of action. *J Biol Chem* 1999;274:27857–27866.
110. Martinez-Balbás MA, Bannister AJ, Martin K, et al. The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription. *EMBO J* 1998;17:2886–2893.
111. Kurihara I, Shibata H, Suzuki T, et al. Expression and regulation of nuclear receptor coactivators in glucocorticoid action. *Mol Cell Endocrinol* 2002;189:181–189.
112. Ito K, Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1 $\beta$ -induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol* 2000;20:6891–6903.
113. Richards DF, Fernandez M, Caulfield J, et al. Glucocorticoids drive human CD8(+) T cell differentiation towards a phenotype with high IL-10 and reduced IL-4, IL-5 and IL-13

- production. *Eur J Immunol* 2000;30:2344–2354.
114. Royer B, Varadaradjalou S, Saas P, et al. Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10. *Clin Exp Allergy* 2001;31:694–704.
115. Arock M, Zuany-Amorim C, Singer M, et al. Interleukin-10 inhibits cytokine generation from mast cells. *Eur J Immunol* 1996;26:166–170.
116. Takanashi S, Nonaka R, Xing Z, et al. Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. *J Exp Med* 1994;180:711–715.
117. Buelens C, Verhasselt V, De Groote D, et al. Interleukin-10 prevents the generation of dendritic cells from human peripheral blood mononuclear cells cultured with interleukin-4 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor. *Eur J Immunol* 1997;27:756–762.
118. Akdis CA, Blesken T, Akdis M, et al. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* 1998;102:98–106.
119. Bentley AM, Hamid Q, Robinson DS, et al. Prednisolone treatment in asthma. Reduction in the numbers of eosinophils, T cells, tryptase-only positive mast cells, and modulation of IL-4, IL-5, and interferon-gamma cytokine gene expression within the bronchial mucosa. *Am J*

*Respir Crit Care Med* 1996;153:551–556.

120. Sher ER, Leung DY, Surs W, et al. Steroid-resistant asthma. Cellular mechanisms contributing to inadequate response to glucocorticoid therapy. *J Clin Invest* 1994;93:33–39.
121. Leung DY, Martin RJ, Szefer SJ, et al. Dysregulation of interleukin 4, interleukin 5, and interferon gamma gene expression in steroid-resistant asthma. *J Exp Med* 1995;181:33–40.
122. Goleva E, Li L-B, Eves PT, et al. Increased glucocorticoid receptor  $\beta$  alters steroid response in glucocorticoid-insensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:607–616.
123. Li L-B, Leung DYM, Martin RJ, et al. Inhibition of histone deacetylase 2 expression by elevated glucocorticoid receptor  $\beta$  in steroid-resistant asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:877–883.
124. Hew M, Bhavsar P, Torrego A, et al. Relative corticosteroid insensitivity of peripheral blood mononuclear cells in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:134–141.
125. Hawrylowicz C, Richards D, Loke T-K, et al. A defect in corticosteroid-induced IL-10 production in T lymphocytes from corticosteroid-resistant asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:369–370.
126. Vazquez-Tello A, Semlali A, Chakir J, et al. Induction of glucocorticoid receptor- $\beta$

- expression in epithelial cells of asthmatic airways by T-helper type 17 cytokines. *Clin Exp Allergy* 2010;40:1312–1322.
127. McKinley L, Alcorn JF, Peterson A, et al. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol* 2008;181:4089–4097.
128. Gudbjartsson DF, Bjornsdottir US, Halapi E, et al. Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction. *Nat Genet* 2009;41:342–347.
129. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, et al. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med* 2010;363:1211–1221.
130. Hirota T, Takahashi A, Kubo M, et al. Genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for adult asthma in the Japanese population. *Nat Genet* 2011;43:893–896.
131. Demenais F, Margaritte-Jeannin P, Barnes KC, et al. Multiancestry association study identifies new asthma risk loci that colocalize with immune-cell enhancer marks. *Nat Genet* 2018;50:42–53.
132. Tantisira KG, Lasky-Su J, Harada M, et al. Genomewide association between GLCCI1 and response to glucocorticoid therapy in asthma. *N Engl J Med* 2011;365:1173–1183.
133. Koster ES, Maitland-van der Zee AH, Tavendale R, et al. FCER2 T2206C variant associated

- with chronic symptoms and exacerbations in steroid-treated asthmatic children. *Allergy* 2011;66:1546–1552.
134. Tantisira KG, Hwang ES, Raby BA, et al. TBX21: a functional variant predicts improvement in asthma with the use of inhaled corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:18099–18104.
135. Mohamed NA, Abdel-Rehim ASM, Farres MN, et al. Influence of glucocorticoid receptor gene NR3C1 646 C>G polymorphism on glucocorticoid resistance in asthmatics: a preliminary study. *Cent Eur J Immunol* 2015;3:325–330.
136. Naylor B. The shedding of the mucosa of the bronchial tree in asthma. *Thorax* 1962;17:69–72.
137. Aikawa T, Shimura S, Sasaki H, et al. Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. *Chest* 1992;101:916–921.
138. James AL, Maxwell PS, Pearce-Pinto G, et al. The relationship of reticular basement membrane thickness to airway wall remodeling in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1590–1595.

139. Elias JA, Zhu Z, Chupp G, et al. Airway remodeling in asthma. *J Clin Invest* 1999;104:1001–1006.
140. Carroll N, Elliot J, Morton A, et al. The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:405–410.
141. Li X, Wilson JW. Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:229–233.
142. James AL, Paré PD, Hogg JC. The mechanics of airway narrowing in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:242–246.
143. Dunican EM, Elicker BM, Gierada DS, et al. Mucus plugs in patients with asthma linked to eosinophilia and airflow obstruction. *J Clin Invest* 2018;128:997–1009.
144. Le Cras TD, Acciani TH, Mushaben EM, et al. Epithelial EGF receptor signaling mediates airway hyperreactivity and remodeling in a mouse model of chronic asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011;300:L414–421.
145. Flood-Page P, Menzies-Gow A, Phipps S, et al. Anti-IL-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatics. *J Clin Invest* 2003;112:1029–1036.



146. Sidhu SS, Yuan S, Innes AL, et al. Roles of epithelial cell-derived periostin in TGF- $\beta$  activation, collagen production, and collagen gel elasticity in asthma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:14170–14175.
147. Song DJ, Cho JY, Lee SY, et al. Anti-Siglec-F antibody reduces allergen-induced eosinophilic inflammation and airway remodeling. *J Immunol* 2009;183:5333–5341.
148. Chen G, Korfhagen TR, Xu Y, et al. SPDEF is required for mouse pulmonary goblet cell differentiation and regulates a network of genes associated with mucus production. *J Clin Invest* 2009;119:2914–2924.
149. Enomoto Y, Orihara K, Takamasu T, et al. Tissue remodeling induced by hypersecreted epidermal growth factor and amphiregulin in the airway after an acute asthma attack. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:913–920.
150. Abraham I, Alhossan A, Lee CS, et al. “Real-life” effectiveness studies of omalizumab in adult patients with severe allergic asthma: systematic review. *Allergy* 2016;71:593–610.
151. Bel EH, Wenzel SE, Thompson PJ, et al. Oral glucocorticoid-sparing effect of mepolizumab in eosinophilic asthma. *N Engl J Med* 2014;371:1189–1197.
152. Nair P, Wenzel S, Rabe KF, et al. Oral glucocorticoid-sparing effect of benralizumab in

- severe asthma. *N Engl J Med* 2017;376:2448–2458.
153. Rabe KF, Nair P, Brusselle G, et al. Efficacy and safety of dupilumab in glucocorticoid-dependent severe asthma. *N Engl J Med* 2018;378:2475–2485.
154. Corren J, Parnes JR, Wang L, et al. Tezepelumab in adults with uncontrolled asthma. *N Engl J Med* 2017;377:936–946.
155. Busse WW, Holgate S, Kerwin E, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of brodalumab, a human anti-IL-17 receptor monoclonal antibody, in moderate to severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188:1294–1302.
156. Bateman ED, Guerrero AG, Brockhaus F, et al. Fevipiprant, an oral prostaglandin DP<sub>2</sub> receptor (CRTh2) antagonist, in allergic asthma uncontrolled on low-dose inhaled corticosteroids. *Eur Respir J* 2017;50:1700670.
157. Pease JE, Horuk R. Recent progress in the development of antagonists to the chemokine receptors CCR3 and CCR4. *Expert Opin Drug Discov* 2014;9:467–483.
158. O'Byrne PM, Metev H, Puu M, et al. Efficacy and safety of a CXCR2 antagonist, AZD5069, in patients with uncontrolled persistent asthma: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Respir Med* 2016;4:797–806.

159. Danek CJ, Lombard CM, Dungworth DL, et al. Reduction in airway hyperresponsiveness to methacholine by the application of RF energy in dogs. *J Appl Physiol* 2004;97:1946–1953.
160. Pretolani M, Bergqvist A, Thabut G, et al. Effectiveness of bronchial thermoplasty in patients with severe refractory asthma: Clinical and histopathologic correlations. *J Allergy Clin Immunol* 2017;139:1176–1185.
161. Haj Salem I, Gras D, Joubert P, et al. Persistent reduction of mucin production after bronchial thermoplasty in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2019;199:536–538.
162. Chupp G, Laviolette M, Cohn L, et al. Long-term outcomes of bronchial thermoplasty in subjects with severe asthma: a comparison of 3-year follow-up results from two prospective multicentre studies. *Eur Respir J* 2017;50:1700017.
163. Sha Q, Truong-Tran AQ, Plitt JR, et al. Activation of airway epithelial cells by Toll-Like receptor agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;31:358–364.
164. Adam E, Hansen KK, Astudillo Fernandez O, et al. The house dust mite allergen Der p 1, unlike Der p 3, stimulates the expression of interleukin-8 in human airway epithelial cells via a proteinase-activated receptor-2-independent mechanism. *J Biol Chem* 2006;281:6910–6923.

165. Dahlin K, Mager EM, Allen L, et al. Identification of genes differentially expressed in rat alveolar type I cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;31:309–316.
166. Visintin A, Latz E, Monks BG, et al. Lysines 128 and 132 enable lipopolysaccharide binding to MD-2, leading to Toll-like receptor-4 aggregation and signal transduction. *J Biol Chem* 2003;278:48313–48320.
167. Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat Med* 2007;13:1042–1049.
168. Hammad H, Chieppa M, Perros F, et al. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med* 2009;15:410–416.
169. Yang H, Hreggvidsdottir HS, Palmblad K, et al. A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:11942–11947.
170. Muzio M, Ni J, Feng P, et al. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* 1997;278:1612–1615.
171. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, et al. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999;11:115–122.

172. Guillot L, Medjane S, Le-Barillec K, et al. Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways. *J Biol Chem* 2004;279:2712–2718.
173. Ramadas RA, Ewart SL, Medoff BD, et al. Interleukin-1 family member 9 stimulates chemokine production and neutrophil influx in mouse lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011;44:134–145.
174. Chustz RT, Nagarkar DR, Poposki JA, et al. Regulation and function of the IL-1 family cytokine IL-1F9 in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011;45:145–153.
175. Angkasekwinai P, Park H, Wang Y-H, et al. Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses. *J Exp Med* 2007;204:1509–1517.
176. Allakhverdi Z, Comeau MR, Jessup HK, et al. Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells. *J Exp Med* 2007;204:253–258.
177. Willart MA, Deswarte K, Pouliot P, et al. Interleukin-1 $\alpha$  controls allergic sensitization to inhaled house dust mite via the epithelial release of GM-CSF and IL-33. *J Exp Med*

2012;209:1505–1517.

178. Chua KY, Stewart GA, Thomas WR, et al. Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p 1. Homology with cysteine proteases. *J Exp Med* 1988;167:175–182.
179. Pichavant M, Charbonnier A-S, Taront S, et al. Asthmatic bronchial epithelium activated by the proteolytic allergen Der p 1 increases selective dendritic cell recruitment. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:771–778.
180. Li B, Zou Z, Meng F, et al. Dust mite-derived Der f 3 activates a pro-inflammatory program in airway epithelial cells via PAR-1 and PAR-2. *Mol Immunol* 2019;109:1–11.
181. Kouzaki H, O’Grady SM, Lawrence CB, et al. Proteases induce production of thymic stromal lymphopoietin by airway epithelial cells through protease-activated receptor-2. *J Immunol* 2009;183:1427–1434.
182. Tomee JF, van Weissenbruch R, de Monchy JG, et al. Interactions between inhalant allergen extracts and airway epithelial cells: effect on cytokine production and cell detachment. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:75–85.
183. Zhou Q, Ho AWS, Schlitzer A, et al. GM-CSF-licensed CD11b<sup>+</sup> lung dendritic cells

- orchestrate Th2 immunity to *Blomia tropicalis*. *J Immunol* 2014;193:496–509.
184. Llop-Guevara A, Chu DK, Walker TD, et al. A GM-CSF/IL-33 pathway facilitates allergic airway responses to sub-threshold house dust mite exposure. *PLoS One* 2014;9:e88714.
185. Park CS, Choi YS, Ki SY, et al. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is the main cytokine enhancing survival of eosinophils in asthmatic airways. *Eur Respir J* 1998;12:872–878.
186. Schröder JM, Kameyoshi Y, Christophers E. RANTES, a novel eosinophil-chemotactic cytokine. *Ann N Y Acad Sci* 1994;725:91–103.
187. Becker S, Reed W, Henderson FW, et al. RSV infection of human airway epithelial cells causes production of the beta-chemokine RANTES. *Am J Physiol* 1997;272:L512–520.
188. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 1963;17:375–412.
189. Georas SN, Rezaee F. Epithelial barrier function: At the front line of asthma immunology and allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2014;134:509–520.
190. Furuse M, Hirase T, Itoh M, et al. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 1993;123:1777–1788.

191. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, et al. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 1998;141:1539–1550.
192. Martín-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, et al. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 1998;142:117–127.
193. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, et al. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997;275:1320–1323.
194. Walters RW, Freimuth P, Moninger TO, et al. Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell* 2002;110:789–799.
195. Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, et al. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 1998;273:29745–29753.
196. LaFemina MJ, Rokkam D, Chandrasena A, et al. Keratinocyte growth factor enhances barrier function without altering claudin expression in primary alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010;299:L724–734.



197. LaFemina MJ, Sutherland KM, Bentley T, et al. Claudin-18 deficiency results in alveolar barrier dysfunction and impaired alveologenesis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014;51:550–558.
198. Herbert CA, King CM, Ring PC, et al. Augmentation of permeability in the bronchial epithelium by the house dust mite allergen Der p1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;12:369–378.
199. Nakamura T, Hirasawa Y, Takai T, et al. Reduction of skin barrier function by proteolytic activity of a recombinant house dust mite major allergen Der f 1. *J Invest Dermatol* 2006;126:2719–2723.
200. Gumbiner B, Stevenson B, Grimaldi A. The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. *J Cell Biol* 1988;107:1575–1587.
201. McCreas PD, Turck CW, Gumbiner B. A homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science* 1991;254:1359–1361.
202. Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, et al. TEER measurement techniques for *in vitro* barrier model systems. *J Lab Autom* 2015;20:107–126.

203. Xiao C, Puddicombe SM, Field S, et al. Defective epithelial barrier function in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128:549–556.
204. Ellerman A, Bisgaard H. Longitudinal study of lung function in a cohort of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J* 1997;10:2376–2379.
205. Zepp JA, Morrissey EE. Cellular crosstalk in the development and regeneration of the respiratory system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019;20:551–566.
206. Ordoñez CL, Khashayar R, Wong HH, et al. Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:517–523.
207. Koeppen M, McNamee EN, Brodsky KS, et al. Detrimental role of the airway mucin Muc5ac during ventilator-induced lung injury. *Mucosal Immunol* 2012;6:762–775.
208. Ehre C, Worthington EN, Liesman RM, et al. Overexpressing mouse model demonstrates the protective role of Muc5ac in the lungs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:16528–16533.
209. Roy MG, Livraghi-Butrico A, Fletcher AA, et al. Muc5b is required for airway defence. *Nature* 2013;505:412–416.
210. Lusuardi M, Capelli A, Di Stefano A, et al. Lung mucosal immunity: immunoglobulin-A

- revisited. *Eur Respir J* 2001;18:571–588.
211. Klockars M, Reitamo S. Tissue distribution of lysozyme in man. *J Histochem Cytochem* 1975;23:932–940.
212. Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, et al. Human  $\beta$ -defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 1997;88:553–560.
213. Singh PK, Jia HP, Wiles K, et al. Production of  $\beta$ -defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14961–14966.
214. Schroeder BO, Wu Z, Nuding S, et al. Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human  $\beta$ -defensin 1. *Nature* 2011;469:419–423.
215. Bowes D, Clark AE, Corrin B. Ultrastructural localisation of lactoferrin and glycoprotein in human bronchial glands. *Thorax* 1981;36:108–115.
216. Drago-Serrano ME, la Garza-Amaya de M, Luna JS, et al. Lactoferrin-lipopolysaccharide (LPS) binding as key to antibacterial and antiendotoxic effects. *Int Immunopharmacol* 2012;12:1–9.
217. Kruzel ML, Bacsı A, Choudhury B, et al. Lactoferrin decreases pollen antigen-induced allergic airway inflammation in a murine model of asthma. *Immunology* 2006;119:159–166.

218. Stolk J, Seersholm N, Kalsheker N. Alpha1-antitrypsin deficiency: current perspective on research, diagnosis, and management. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2006;1:151–160.
219. Lee CH, Igarashi Y, Hohman RJ, et al. Distribution of secretory leukoprotease inhibitor in the human nasal airway. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:710–716.
220. Kouzaki H, Matsumoto K, Kikuoka H, et al. Endogenous Protease inhibitors in airway epithelial cells contribute to eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;195:737–747.
221. Cayrol C, Duval A, Schmitt P, et al. Environmental allergens induce allergic inflammation through proteolytic maturation of IL-33. *Nat Immunol* 2018;19:375–385.
222. Kouzaki H, Iijima K, Kobayashi T, et al. The danger signal, extracellular ATP, is a sensor for an airborne allergen and triggers IL-33 release and innate Th2-type responses. *J Immunol* 2011;186:4375–4387.
223. Raundhal M, Morse C, Khare A, et al. High IFN- $\gamma$  and low SLPI mark severe asthma in mice and humans. *J Clin Invest* 2015;125:3037–3050.
224. Prasad D, Rothlin CV, Burrola P, et al. TAM receptor function in the retinal pigment epithelium. *Mol Cell Neurosci* 2006;33:96–108.

225. Scutera S, Fraone T, Musso T, et al. Survival and migration of human dendritic cells are regulated by an IFN- $\alpha$ -inducible Axl/Gas6 pathway. *J Immunol* 2009;183:3004–3013.
226. Schmid ET, Pang IK, Carrera Silva EA, et al. AXL receptor tyrosine kinase is required for T cell priming and antiviral immunity. *Elife* 2016;5:e12414.
227. Zahuczky G, Kristóf E, Majai G, et al. Differentiation and glucocorticoid regulated apopto-phagocytic gene expression patterns in human macrophages. Role of Mertk in enhanced phagocytosis. Role of Mertk in enhanced phagocytosis. *PLoS One* 2011;6:e21349.
228. Fujimori T, Grabiec AM, Kaur M, et al. The Axl receptor tyrosine kinase is a discriminator of macrophage function in the inflamed lung. *Mucosal Immunol* 2015;8:1021–1030.
229. Lu Q, Gore M, Zhang Q, et al. Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis. *Nature* 1999;398:723–728.
230. Stitt TN, Conn G, Gore M, et al. The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell* 1995;80:661–670.
231. Mark MR, Chen J, Hammonds RG, et al. Characterization of Gas6, a member of the superfamily of G domain-containing proteins, as a ligand for Rse and Axl. *J Biol Chem* 1996;271:9785–9789.

232. Nagata K, Ohashi K, Nakano T, et al. Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1996;271:30022–30027.
233. Lew ED, Oh J, Burrola PG, et al. Differential TAM receptor-ligand-phospholipid interactions delimit differential TAM bioactivities. *Elife* 2014;3:e03385.
234. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992;148:2207–2216.
235. Huang M, Rigby AC, Morelli X, et al. Structural basis of membrane binding by Gla domains of vitamin K–dependent proteins. *Nat Struct Mol Biol* 2003;10:751–756.
236. Bandyopadhyay PK. Vitamin K-dependent  $\gamma$ -glutamylcarboxylation: an ancient posttranslational modification. *Vitam Horm* 2008;78:157–184.
237. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000;103:211–225.
238. Taylor IC, Roy S, Varmus HE. Overexpression of the Sky receptor tyrosine kinase at the cell surface or in the cytoplasm results in ligand-independent activation. *Oncogene* 1995;11:2619–2626.

239. Sasaki T, Knyazev PG, Cheburkin Y, et al. Crystal structure of a C-terminal fragment of growth srrest-specific protein Gas6. Receptor tyrosine kinase activation by laminin G-like domains. *J Biol Chem* 2002;277:44164–44170.
240. Weinger JG, Gohari P, Yan Y, et al. In brain, Axl recruits Grb2 and the p85 regulatory subunit of PI3 kinase; in vitro mutagenesis defines the requisite binding sites for downstream Akt activation. *J Neurochem* 2008;106:134–146.
241. Weinger JG, Brosnan CF, Loudig O, et al. Loss of the receptor tyrosine kinase Axl leads to enhanced inflammation in the CNS and delayed removal of myelin debris during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation* 2011;8:49–18.
242. Rothlin CV, Ghosh S, Zuniga EI, et al. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell* 2007;131:1124–1136.
243. Surh CD, Sprent J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 1994;372:100–103.
244. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68:251–306.
245. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, et al. Macrophages that have ingested apoptotic cells in

- vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub>, and PAF. *J Clin Invest* 1998;101:890–898.
246. Bosurgi L, Cao YG, Cabeza-Cabrero M, et al. Macrophage function in tissue repair and remodeling requires IL-4 or IL-13 with apoptotic cells. *Science* 2017;356:1072–1076.
247. Lu Q, Lemke G. Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science* 2001;293:306–311.
248. Scott RS, McMahon EJ, Pop SM, et al. Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* 2001;411:207–211.
249. Zagórska A, Través PG, Lew ED, et al. Diversification of TAM receptor tyrosine kinase function. *Nat Immunol* 2014;15:920–928.
250. Wallet MA, Sen P, Flores RR, et al. MerTK is required for apoptotic cell-induced T cell tolerance. *J Exp Med* 2008;205:219–232.
251. Schell SL, Soni C, Fasnacht MJ, et al. Mer receptor tyrosine kinase signaling prevents self-ligand sensing and aberrant selection in germinal centers. *J Immunol* 2017;199:4001–4015.
252. Woolley KL, Gibson PG, Carty K, et al. Eosinophil apoptosis and the resolution of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:237–243.



253. Grabiec AM, Denny N, Doherty JA, et al. Diminished airway macrophage expression of the Axl receptor tyrosine kinase is associated with defective efferocytosis in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2017;140:1144–1146.
254. Chan PY, Carrera Silva EA, De Kouchkovsky D, et al. The TAM family receptor tyrosine kinase TYRO3 is a negative regulator of type 2 immunity. *Science* 2016;352:99–103.
255. Fujino N, Brand OJ, Morgan DJ, et al. Sensing of apoptotic cells through Axl causes lung basal cell proliferation in inflammatory diseases. *J Exp Med* 2019;216:2184–2201.
256. Modena BD, Tedrow JR, Milosevic J, et al. Gene expression in relation to exhaled nitric oxide identifies novel asthma phenotypes with unique biomolecular pathways. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;190:1363–1372.
257. Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J* 2014;43:343–373.
258. Richter A, Puddicombe SM, Lordan JL, et al. The contribution of interleukin (IL)-4 and IL-13 to the epithelial-mesenchymal trophic unit in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25:385–391.
259. Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention.

Fontana, WI, USA, 2019. Available at: <https://www.ginasthma.org/>.

260. Hickman DL, Johnson SW. Evaluation of the aesthetics of physical methods of euthanasia of anesthetized rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2011;50:695–701.
261. Reddel RR, Ke Y, Gerwin BI, et al. Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res* 1988;48:1904–1909.
262. Wang X, Seed B. A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. *Nucleic Acids Res* 2003;31:e154.
263. Lefever S, Vandesompele J, Speleman F, et al. RTPrimerDB: the portal for real-time PCR primers and probes. *Nucleic Acids Res* 2009;37:D942–945.
264. Spandidos A, Wang X, Wang H, et al. PrimerBank: a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification. *Nucleic Acids Res* 2009;38:D792–799.
265. Spandidos A, Wang X, Wang H, et al. A comprehensive collection of experimentally validated primers for Polymerase Chain Reaction quantitation of murine transcript

- abundance. *BMC Genomics* 2008;9:633.
266. Bauer JA, Thompson TA, Church DR, et al. Growth inhibition and differentiation in human prostate carcinoma cells induced by the vitamin D analog 1 $\alpha$ ,24-dihydroxyvitamin D<sub>2</sub>. *Prostate* 2003;55:159–167.
267. Harada M, Hirota T, Jodo AI, et al. Functional analysis of the thymic stromal lymphopoietin variants in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;40:368–374.
268. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001;25:402–408.
269. Ishii T, Niikura Y, Kurata K, et al. Time-dependent distinct roles of Toll-like receptor 4 in a house dust mite-induced asthma mouse model. *Scand J Immunol* 2018;38:42–49.
270. Misharin AV, Morales-Nebreda L, Mutlu GM, et al. Flow cytometric analysis of macrophages and dendritic cell subsets in the mouse lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013;49:503–510.
271. Schreck R, Baeuerle PA. NF-kappa B as inducible transcriptional activator of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene. *Mol Cell Biol* 1990;10:1281–1286.
272. Moriuchi H, Moriuchi M, Fauci AS. Nuclear factor-kappa B potently up-regulates the

- promoter activity of RANTES, a chemokine that blocks HIV infection. *J Immunol* 1997;158:3483–3491.
273. Kimura H, Inukai Y, Takii T, et al. Molecular analysis of constitutive IL-1 $\alpha$  gene expression in human melanoma cells: autocrine stimulation through NF-kappaB activation by endogenous IL-1 $\alpha$ . *Cytokine* 1998;10:872–879.
274. Hutti JE, Turk BE, Asara JM, et al. IkappaB kinase  $\beta$  phosphorylates the K63 deubiquitinase A20 to cause feedback inhibition of the NF-kappaB pathway. *Mol Cell Biol* 2007;27:7451–7461.
275. Schuijs MJ, Willart MA, Vergote K, et al. Farm dust and endotoxin protect against allergy through A20 induction in lung epithelial cells. *Science* 2015;349:1106–1110.
276. Lambrecht BN, Hammad H, Fahy JV. The Cytokines of Asthma. *Immunity* 2019;50:975–991.
277. Juncadella IJ, Kadl A, Sharma AK, et al. Apoptotic cell clearance by bronchial epithelial cells critically influences airway inflammation. *Nature* 2013;493:547–551.
278. Wertz IE, Newton K, Seshasayee D, et al. Phosphorylation and linear ubiquitin direct A20 inhibition of inflammation. *Nature* 2015;528:370–375.

279. McKenzie AN, Li X, Largaespada DA, et al. Structural comparison and chromosomal localization of the human and mouse IL-13 genes. *J Immunol* 1993;150:5436–5444.
280. McKenzie AN, Culpepper JA, de Waal Malefyt R, et al. Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3735–3739.
281. Morita H, Kubo T, Rückert B, et al. Induction of human regulatory innate lymphoid cells from group 2 innate lymphoid cells by retinoic acid. *J Allergy Clin Immunol* 2019;143:2190–2201.
282. Fujino N, Kubo H, Maciewicz RA. Phenotypic screening identifies Axl kinase as a negative regulator of an alveolar epithelial cell phenotype. *Lab Invest* 2017;97:1047–1062.
283. Shibata T, Habel DM, Coelho AL, et al. Axl receptor blockade ameliorates pulmonary pathology resulting from primary viral infection and viral exacerbation of asthma. *J Immunol* 2014;192:3569–3581.
284. Ye X, Li Y, Stawicki S, et al. An anti-Axl monoclonal antibody attenuates xenograft tumor growth and enhances the effect of multiple anticancer therapies. *Oncogene* 2010;29:5254–5264.

285. Ekman C, Stenhoff J, Dahlbäck B. Gas6 is complexed to the soluble tyrosine kinase receptor Axl in human blood. *J Thromb Haemost* 2010;8:838–844.
286. Haque SJ, Harbor P, Tabrizi M, et al. Protein-tyrosine phosphatase Shp-1 is a negative regulator of IL-4- and IL-13-dependent signal transduction. *J Biol Chem* 1998;273:33893–33896.
287. Wurster AL, Tanaka T, Grusby MJ. The biology of Stat4 and Stat6. *Oncogene* 2000;19:2577–2584.
288. Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 1998;282:2258–2261.
289. Shinkai A, Yoshisue H, Koike M, et al. A novel human CC chemokine, eotaxin-3, which is expressed in IL-4-stimulated vascular endothelial cells, exhibits potent activity toward eosinophils. *J Immunol* 1999;163:1602–1610.
290. Her E, Frazer J, Austen KF, et al. Eosinophil hematopoietins antagonize the programmed cell death of eosinophils. Cytokine and glucocorticoid effects on eosinophils maintained by endothelial cell-conditioned medium. *J Clin Invest* 1991;88:1982–1987.
291. Simon HU, Yousefi S, Dibbert B, et al. Anti-apoptotic signals of granulocyte-macrophage

- colony-stimulating factor are transduced via Jak2 tyrosine kinase in eosinophils. *Eur J Immunol* 1997;27:3536–3539.
292. Saha S, Doe C, Mistry V, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression in induced sputum and bronchial mucosa in asthma and COPD. *Thorax* 2009;64:671–676.
  293. Fitzpatrick AM, Higgins M, Holguin F, et al. The molecular phenotype of severe asthma in children. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:851–857.
  294. Goruppi S, Ruaro E, Varnum B, et al. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway and Src for Gas6-Axl mitogenic and survival activities in NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1997;17:4442–4453.
  295. Taggart CC, Greene CM, McElvaney NG, et al. Secretory leucoprotease inhibitor prevents lipopolysaccharide-induced IkappaBalpha degradation without affecting phosphorylation or ubiquitination. *J Biol Chem* 2002;277:33648–33653.
  296. Kurowska-Stolarska M, Alivernini S, Melchor EG, et al. MicroRNA-34a dependent regulation of AXL controls the activation of dendritic cells in inflammatory arthritis. *Nat Commun* 2017;8:15877.

297. Fritz HK, Gustafsson A, Ljungberg B, et al. The Axl-regulating tumor suppressor miR-34a is increased in ccRCC but does not correlate with Axl mRNA or Axl protein levels. *PLoS One* 2015;10:e0135991.



## 図の説明

### 図1. TAM 受容体とリガンド

TAM 受容体とリガンドの模式図。TAM 受容体 (Tyro3、Axl、Mertk) は樹状細胞、マクロファージ、セルトリ細胞、網膜色素上皮細胞に発現することが知られる細胞膜貫通型受容体チロシンキナーゼである。リガンドである Gas6、protein S は恒常的に TAM 受容体に結合した状態で存在し、リガンドによって活性化した受容体は二量体を形成する。リガンドがアポトーシス細胞の細胞膜上に存在する phosphatidylserine に結合すると、細胞質内の TAM 受容体チロシンキナーゼドメインがリン酸化され、細胞内シグナル伝達を開始される。

P: リン酸化状態を意味する。

Gas6: growth arrest specific 6。

### 図2. 野生型 C57BL/6マウスおよび *Axl*<sup>+/+</sup>マウスの遺伝子型決定

マウス尾から抽出したゲノム DNA の PCR 産物をアガロースゲル中で電気泳動した。野生型遺伝子は368塩基対、変異型遺伝子は275塩基対として同定した。

PCR: polymerase chain reaction、bp: base pair (塩基対)。

### 図3. Severe Asthma Research Program (SARP) の喘息患者の気道上皮細胞における

#### TAM 受容体とリガンド発現の検討

(A-E) 健常者 (n = 27)、軽症・中等症喘息 (n = 72)、重症喘息 (n = 56) の気管支上皮擦過検体の網羅的遺伝子発現解析 (SARP; accession: GSE 63142) における *AXL* (A)、*MERTK* (B)、*TYRO3* (C)、*GAS6* (D)、*PROS1* (E) の相対的発現量。結果は中央値 ± 四分位範囲で表記した。3群の比較には Dunn の多重比較検定後に Kruskal-Wallis 検定を用いた。\*P<0.05対健常者、\*\*P<0.01対健常者、\*\*\*\*P<0.0001対健常者、††P<0.01対軽症・中等症喘息を表す。

*PROS1*: protein S、N.S.: not significant。

### 図4. Unbiased BIOmarkers in Prediction of REspiratory Disease outcomes (U-BIOPRED)

#### Project の喘息患者の気道上皮細胞における TAM 受容体とリガンド発現の検討

(A-E) 中等症喘息 (n = 35)、重症喘息 (n = 56) の気管支生検組織の網羅的遺伝子発現解析 (U-BIOPRED; accession: GSE 76227) における *AXL* (A)、*MERTK* (B)、*TYRO3* (C)、*GAS6* (D)、*PROS1* (E) の相対的発現量。2群の比較には Mann-Whitney 検定を用いた。\*P<0.05対中等症喘息を表す。

N.S.: not significant。

## 図 5. 喘息患者気管支生検組織の気道上皮細胞における Axl 発現の検討

(A-B) 非喘息 (n = 7)、軽症・中等症喘息 (n = 7)、重症喘息 (n = 10) の気管支生検組織を用いて Keratin5 (基底細胞マーカー) と Axl の二重蛍光免疫染色を行った。(A) Keratin5 (マゼンタ) と Axl (緑) の二重蛍光免疫染色。青は DAPI による核染色を表す。厚さ  $0.15\ \mu\text{m}$  の単一 Z 軸ステップを示す。Scale bar:  $25\ \mu\text{m}$ 。(B) Keratin5<sup>+</sup>Axl<sup>+</sup>基底細胞数 / Keratin5<sup>+</sup>基底細胞数 (%) を表す。結果は中央値  $\pm$  四分位範囲で表記した。3群の比較には Dunn の多重比較検定後に Kruskal-Wallis 検定を用いた。 $**P < 0.01$  対非喘息、 $\dagger\dagger P < 0.01$  対軽症・中等症喘息を表す。

N.S.: not significant。

## 図 6. 喘息患者気管支生検組織の気道上皮細胞における検体採取前全身性ステロイド投与の有無による Axl 発現の比較

軽症・中等症喘息 (n = 7)、重症喘息 (n = 10) の気管支生検組織を用いて Keratin5 (基底細胞マーカー) と Axl の二重蛍光免疫染色を行った。生検目的の気管支鏡検査前の全身性ステロイド投与群と非投与群の間で Keratin5<sup>+</sup>Axl<sup>+</sup>基底細胞数/Keratin5<sup>+</sup>基底細胞数 (%) を比較した。黄色円は軽症・中等症喘息、マゼンタ色円は重症喘息を意味する。結果は中央値  $\pm$  四分位範囲で表記した。2群の比較には Mann-Whitney 検定を用いた。

N.S.: not significant。

## 図 7. 喘息患者気管支生検組織の気道上皮細胞における Axl 発現と臨床背景の相関分析

(A-G) 気管支生検組織採取患者における年齢 (A)、喫煙歴 (B)、BMI (C)、血清総 IgE (D)、末梢血好酸球数 (E)、PC20-Ach (F)、FEV<sub>1</sub> (% predicted) (G) と Keratin5<sup>+</sup>Axl<sup>+</sup>基底細胞数/Keratin5<sup>+</sup>基底細胞数 (%) の相関分析。黄色円は軽症・中等症喘息、マゼンタ色円は重症喘息を表す。r は Pearson の相関係数を意味する。太字は P<0.05 を表す。

Pack-years = (1日の喫煙本数 / 20本) × 喫煙年数を示す。

BMI: body mass index、FEV<sub>1</sub> (% predicted): % predicted values of forced expiratory volume in 1 second (予測1秒量に対する比率)、IgE: immunoglobulin E (免疫グロブリン E)、PC20-Ach: provocative concentration of acetylcholine that results in a 20% fall in FEV<sub>1</sub> (1秒量を20%低下させるのに要するアセチルコリンの濃度)。

## 図 8. 喘息患者気管支生検組織の好酸球染色、マスト細胞染色

(A-D) 軽症・中等症喘息 (n = 7) (A-B)、重症喘息 (n = 10) (C-D) の気管支生検組織を用いて好酸球染色、マスト細胞染色を行った。生検目的の気管支鏡検査前の全身性ステロイド投与群 (A、C) と非投与群 (B、D) を示す。マゼンタ色矢印は好酸球、黒色矢頭はマスト細胞を表す。Scale bar: 25  $\mu$ m。

## 図9. 喘息患者気管支生検組織の気道上皮細胞における Axl 発現と好酸球数、マスト

### 細胞数の相関分析

(A-D) 軽症・中等症喘息 (n = 7)、重症喘息 (n = 10) の気管支生検組織を用いて好酸球染色、マスト細胞染色疫染色を行った。基底膜長100  $\mu\text{m}$  あたりの気管支粘膜下組織に浸潤する好酸球数 (A-B)、マスト細胞数 (C-D) と Keratin5<sup>+</sup>Axl<sup>+</sup>基底細胞数/Keratin5<sup>+</sup>基底細胞数 (%) の相関分析。生検目的の気管支鏡検査前の全身性ステロイド投与群 (A、C) と非投与群 (B、D) を表す。黄色円は軽症・中等症喘息、マゼンタ色円は重症喘息を意味する。r は Pearson の相関係数を示す。太字は  $P < 0.05$  を表す。

## 図10. HDM 投与による野生型 C57BL/6マウスの2型気道炎症の評価

(A) HDM 投与スケジュールのスキーマ。初回投与日を1日目、最終投与日を15日目とし、1日または2日おきに計7回 HDM または PBS を経鼻投与した。16日目に気管支肺胞洗浄液を採取し肺を摘出した。(B-C) 気管支肺胞洗浄液の Diff-Quik 染色を行い、炎症細胞数を計数した。(B) 気管支肺胞洗浄液1 mL あたりの総細胞数、好中球数、好酸球数、マクロファージ数、リンパ球数。白色円は PBS 投与群マウス、灰色円は HDM 投与群マウスを表す。(C) 気管支肺胞洗浄液の Diff-Quik 染色。(D) 肺切片の HE 染色、PAS 染色。Scale bar: (C) 20  $\mu\text{m}$ 、(D) 100  $\mu\text{m}$ 。各群 n = 4、結果は平均  $\pm$  標準誤差で表記した。PBS 投与群を対照とし、2群の比較には Student の t 検定を用いた。\*\* $P < 0.01$ 、\*\*\*\* $P < 0.0001$ を表す。

HDM: house dust mite extract、HE: hematoxylin-eosin、PAS: periodic acid-Schiff。

#### 図 11. HDM 投与後のマウス気管上皮における Keratin5<sup>+</sup>Axl<sup>+</sup>細胞の検討

マウスに HDM を経鼻投与し、最終投与の翌日に気管上皮の蛍光免疫染色を行った。対照群は無刺激とし、Axl 免疫染色の陰性コントロールには *Axl*<sup>-/-</sup>マウスを使用した。(A) Keratin5 (マゼンタ) と Axl (緑) の二重蛍光免疫染色。青は DAPI による核染色を表す。Scale bar: 25  $\mu$ m。C57BL/6マウスは各群 n=4、*Axl*<sup>-/-</sup>マウスは各群 n=2。

#### 図 12. HDM 投与後のマウス気管上皮における Scgb1a1<sup>+</sup>Axl<sup>+</sup>細胞の検討

マウスに HDM を経鼻投与し、最終投与の翌日に気管上皮の蛍光免疫染色を行った。対照群は無刺激とし、Axl 免疫染色の陰性コントロールには *Axl*<sup>-/-</sup>マウスを使用した。(A) Scgb1a1 (マゼンタ) と Axl (緑) の二重蛍光免疫染色。青は DAPI による核染色を表す。Scale bar: 25  $\mu$ m。C57BL/6マウスは各群 n=5、*Axl*<sup>-/-</sup>マウスは各群 n=2。

#### 図 13. HDM 投与後のマウス気管上皮における Foxj1<sup>+</sup>Axl<sup>+</sup>細胞の検討

マウスに HDM を経鼻投与し、最終投与の翌日に気管上皮の蛍光免疫染色を行った。対照群は無刺激とし、Axl 免疫染色の陰性コントロールには *Axl*<sup>-/-</sup>マウスを使用した。Foxj1 (マゼンタ) と Axl (緑) の二重蛍光免疫染色。青は DAPI による核染色を表す。Scale bar: 25  $\mu$ m。

C57BL/6マウスは各群 n = 5、*Axl*<sup>-/-</sup>マウスは各群 n = 2。

#### 図 14. HDM 投与後のマウス気管の血球細胞における *Axl* 発現の検討

C57BL/6マウスと *Axl*<sup>-/-</sup>マウスに HDM または PBS を経鼻投与し、最終投与の翌日に気管と左肺の単一細胞懸濁液を作成した。フローサイトメトリーにより好酸球 (CD45<sup>pos</sup>/Lin<sup>neg</sup>/Siglec<sup>Fhi</sup>/CD11c<sup>neg</sup>)、好中球 (CD45<sup>pos</sup>/Lin<sup>neg</sup>/Ly6G<sup>pos</sup>/CD11b<sup>hi</sup>)、樹状細胞 (CD45<sup>pos</sup>/Lin<sup>neg</sup>/CD11c<sup>hi</sup>/MHCII<sup>hi</sup>)、肺胞マクロファージ (CD45<sup>pos</sup>/Lin<sup>neg</sup>/CD11b<sup>lo</sup>/CD11c<sup>hi</sup>/Siglec<sup>Fhi</sup>) における *Axl* 発現を検討した。代表的なヒストグラムを示す。灰色のヒストグラムは C57BL/6マウス、白色 (点線) のヒストグラムは *Axl*<sup>-/-</sup>マウスを表す。気管では肺胞マクロファージは検出されなかった。C57BL/6マウスは PBS 投与群 n = 4、HDM 投与群 n = 6、*Axl*<sup>-/-</sup>マウスは PBS 投与群 n = 4、HDM 投与群 n = 6。

Lin: lineage marker、hi: high、lo: low、neg: negative、pos: positive、PE: phycoerythrin。

#### 図 15. HDM 投与後の C57BL/6マウスと *Axl*<sup>-/-</sup>マウス気管と肺に浸潤する好酸球と好中球の同定

(A-B) C57BL/6マウスと *Axl*<sup>-/-</sup>マウスに HDM または PBS を経鼻投与し、最終投与の翌日に気管と左肺の単一細胞懸濁液を作成した。フローサイトメトリーによる気管 (A) と左肺 (B) の好酸球 (CD45<sup>pos</sup>/Lin<sup>neg</sup>/Siglec<sup>Fhi</sup>/CD11c<sup>neg</sup>) および好中球 (CD45<sup>pos</sup>/Lin<sup>neg</sup>/Ly6G<sup>pos</sup>/

CD11b<sup>hi</sup>) の代表的なドットプロットを示す。C57BL/6マウスはPBS 投与群 n = 4、HDM 投与群 n = 6、*Axl*<sup>-/-</sup>マウスはPBS 投与群 n = 4、HDM 投与群 n = 6。

BV: Brilliant Violet、PerCP: Peridinin-chlorophyll-protein Complex。

## 図 16. HDM 投与後の C57BL/6マウスと *Axl*<sup>-/-</sup>マウス気管と肺に浸潤する好酸球数と好中球数の定量

(A-B) C57BL/6マウスと *Axl*<sup>-/-</sup>マウスに HDM または PBS を経鼻投与し、最終投与の翌日に気管と左肺の単一細胞懸濁液を作成した。フローサイトメトリーにより気管 (A) と左肺 (B) の好酸球数と好中球数を定量した。赤色円は C57BL/6マウス、青色正方形は *Axl*<sup>-/-</sup>マウスを表す。C57BL/6マウスは PBS 投与群 n=4、HDM 投与群 n=6、*Axl*<sup>-/-</sup>マウスは PBS 投与群 n=4、HDM 投与群 n=6。結果は平均 ± 標準誤差で表記した。各群の比較には one way analysis of variance (ANOVA) 後に Tukey 検定を用いた。\*P<0.05、\*\*P<0.01を示す。

N.S.: not significant。

## 図 17. HDM 投与後の C57BL/6マウスと *Axl*<sup>-/-</sup>マウスの気管と肺切片の病理組織学的検討

(A-B) C57BL/6マウスと *Axl*<sup>-/-</sup>マウスに HDM または PBS を経鼻投与し、最終投与の翌日に気管と肺を摘出し切片を作成した。(A) 気管切片の HE 染色と PAS 染色。各群 n = 4。 (B)



肺切片の HE 染色と PAS 染色。C57BL/6マウスは PBS 投与群 n = 4、HDM 投与群 n = 6、  
*Axl*<sup>-/-</sup>マウスは PBS 投与群 n = 4、HDM 投与群 n = 6。Scale bar: (A-B) 100  $\mu$ m。

## 図 18. BEAS-2B 細胞における *Axl* と *Gas6*発現の検討

(A-B) BEAS-2B 細胞における *AXL* (A) と *GAS6* (B) の遺伝子発現を検討するため、定量 PCR を行った。内因性コントロールには *ACTB* を用いた。Three well replicates それぞれの duplicate で PCR を行い、結果を増幅曲線で示した (n = 1、n は実験回数)。 $\Delta Rn$  は PCR により生じた蛍光シグナルの大きさを意味する。(C) BEAS-2B 細胞における *Axl* 蛋白の発現をフローサイトメトリーにより検討した。Three well replicates のうち代表的なヒストグラムを示す (n = 1、n は実験回数)。赤色のヒストグラムは PE 標識抗ヒト *Axl* 抗体の染色、青色のヒストグラムはアイソタイプコントロールの染色を表す。(D) *Axl* 阻害剤 (R428) 刺激による phospho *Axl* 蛋白発現の変化を ELISA により定量した。hrGas6 100 ng/mL による刺激を15分間行った後、図に示す濃度で R428を培養上清へ添加し3時間反応させた。Phospho *Axl* 蛋白の発現を total *Axl* 蛋白の発現に対する比で示す。結果は three well replicates の平均  $\pm$  標準偏差で示した (n = 1、n は実験回数)。0.1%DMSO 添加群を対照として、one way analysis of variance (ANOVA) 後に Dunnett 検定を用いた。\*\*\*P < 0.001、\*\*\*\*P < 0.0001を表す。

*ACTB*:  $\beta$ -actin、hrGas6: recombinant human Gas6、phospho *Axl*: phosphorylated *Axl*。

### 図 19. BEAS-2B 細胞の Axl 発現抑制に必要な siRNA 濃度の検討

(A-F) siRNA (siAxl #1) トランスフェクションにより BEAS-2B 細胞の Axl をノックダウンした。siRNA の最終濃度は 0.1 nM (A)、0.5 nM (B)、1 nM (C)、2.5 nM (D)、5 nM (E)、10 nM (F) である。未処置の細胞 (Untreated)、Lipofectamine のみで処置した細胞 (Lipofectamine)、特定の蛋白発現を抑制する機能を持たない non-targeting siRNA と Lipofectamine で処置した細胞 (siNTC) を対照群として用いた。siRNA トランスフェクションから 48 時間後に RNA を回収し、*AXL* の相対的発現量を定量 PCR により検討した。結果は three well replicates の平均  $\pm$  標準偏差で表記した ( $n = 1$ ,  $n$  は実験回数)。各群の比較には、one way analysis of variance (ANOVA) 後に Tukey 検定を用いた。 $*P < 0.05$ 、 $***P < 0.001$ 、 $****P < 0.0001$ を表す。

siRNA: small interfering RNA、siAxl #1: Axl-targeting siRNA #1、siNTC: non-targeting control siRNA、N.S.: not significant。

### 図 20. siRNA トランスフェクションによる BEAS-2B 細胞の Axl 発現抑制の検討

(A-C) siRNA (siAxl #1、siAxl #2; 最終濃度 2.5 nM) トランスフェクションにより BEAS-2B 細胞の Axl をノックダウンした。(A) siRNA トランスフェクションから 48 時間後に RNA を回収し、*AXL* の相対的発現量を定量 PCR により検討した。結果は平均  $\pm$  標準偏差で表記した ( $n = 3$ ,  $n$  は実験回数)。(B-C) siRNA トランスフェクションから 72 時間後に細胞溶解液を回収し、ウェスタンブロッティングにより total Axl の発現を検討した。内因性コントロール

には  $\beta$ -actin を用いた。(B) 代表的なバンド画像。(C) Axl 蛋白の相対発現量。結果は three well replicates の平均  $\pm$  標準偏差で表記した ( $n = 1$ ,  $n$  は実験回数)。各群の比較には、one way analysis of variance (ANOVA) 後に Tukey 検定を用いた。\*\*\* $P < 0.001$ 、\*\*\*\* $P < 0.0001$ を表す。

siAxl #2: Axl-targeting siRNA #2。

## 図 21. Axl により発現制御を受ける気道上皮細胞由来サイトカイン、ケモカインの検討

(A-F) siRNA (siAxl #1, siAxl #2; 最終濃度 2.5 nM) トランスフェクションにより BEAS-2B 細胞の Axl をノックダウンした。(A-B) siRNA トランスフェクション 72 時間後に HDM (40  $\mu\text{g/mL}$ )、hrIL-4 (30 ng/mL) と hrIL-13 (30 ng/mL)、または hr TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) を培養上清中に添加した。6 時間後に RNA を回収し、*CSF2*、*CCL5*、*CCL11*、*CCL24*、*IL33*、*TSLP*、*CXCL8*、*CXCL1* の相対的発現量を定量 PCR により比較した。(A) 実験のスキーマ。(B) 定量 PCR の結果。three well replicates の平均値をヒートマップで示した。(C-D) siRNA トランスフェクション 72 時間後に HDM (0.4  $\mu\text{g/mL}$ 、4  $\mu\text{g/mL}$ 、40  $\mu\text{g/mL}$ ) または PBS を培養上清中に添加した。6 時間後に RNA を回収し、*CSF2* (C)、*CCL5* (D) の相対的発現量を定量 PCR により比較した。結果は three well replicates の平均  $\pm$  標準偏差で表記した ( $n = 1$ ,  $n$  は実験回数)。(E-F) siRNA トランスフェクション 72 時間後に HDM (4  $\mu\text{g/mL}$ ) または PBS を培養上清中に添加した。24 時間後に培養上清を回収し、GM-CSF (E) と RANTES (F) の蛋白濃度を ELISA により定量した。独立した実験を 3 回行い、代表的な 1 回の実験結果を three well replicates の平

均 ± 標準偏差で表記した (n = 3、n は実験回数)。N.D.のサンプルは0 pg/mL として統計計算を実施した。Two way analysis of variance (ANOVA) 後に Tukey 検定を行った。\*\*\*\*P<0.0001 対 siNTC トランスフェクション後 HDM (4 µg/mL) 添加群を表す。

hrIL-4: recombinant human interleukin-4、hrIL-13: recombinant human interleukin-13、hrTNF-α: recombinant human tumor necrosis factor-α、*CSF2*: colony stimulating factor 2、*CCL5*: C-C motif chemokine ligand 5、*CCL11*: C-C motif chemokine ligand 11、*CCL24*: C-C motif chemokine ligand 24、*IL33*: interleukin-33、*TSLP*: thymic stromal lymphopoietin、lTSLP: long form of thymic stromal lymphopoietin、*CXCL8*: C-X-C motif chemokine ligand 8、*CXCL1*: C-X-C motif chemokine ligand 1、GM-CSF: granulocyte macrophage colony-stimulating factor、RANTES: regulated on activation, normal T cell expressed and secreted、N.D.: not detected。

## 図 22. SARP の喘息患者の気道上皮細胞における GM-CSF、RANTES の遺伝子発現の検討

(A-B) 健常者 (n = 27)、軽症・中等症喘息 (n = 72)、重症喘息 (n = 56) の気管支上皮擦過検体の網羅的遺伝子発現解析 (SARP; accession: GSE 63142) における *CSF2* (A)、*CCL5* (B) の相対的発現量。結果は中央値 ± 四分位範囲で表記した。3群の比較には Dunn の多重比較検定後に Kruskal-Wallis 検定を用いた。

N.S.: not significant。

**図 23. U-BIOPRED Project の喘息患者の気道上皮細胞における GM-CSF、RANTES の**

**遺伝子発現の検討**

(A-B) 中等症喘息 (n = 35)、重症喘息 (n = 56) の気管支生検組織の網羅的遺伝子発現解析 (U-BIOPRED; accession: GSE 76227) における *CSF2* (A)、*CCL5* (B) の相対的発現量。2群の比較には Mann-Whitney 検定を用いた。

N.S.: not significant。

**図 24. Axl ノックダウンによる気道上皮細胞の *IL-1 $\alpha$*  の遺伝子発現変動の検討**

siRNA (siAxl #1、siAxl #2; 最終濃度2.5 nM) トランスフェクションにより BEAS-2B 細胞の Axl をノックダウンした。siRNA トランスフェクション72時間後に HDM (40  $\mu$ g/mL) を培養上清中に添加した。6時間後に RNA を回収し、*IL1A* の相対的発現量を定量 PCR により比較した。結果は three well replicates の平均  $\pm$  標準偏差で示した (n=1、n は実験回数)。各群の比較には、one way analysis of variance (ANOVA) 後に Tukey 検定を行った。\*\*P<0.01を表す。

*IL1A*: interleukin-1 $\alpha$ 。

**図 25. Axl ノックダウンによる気道上皮細胞の SOCS1、SOCS3の遺伝子発現変動の検討**

(A-B) siRNA (siAxl #1、siAxl #2; 最終濃度2.5 nM) トランスフェクションにより BEAS-2B 細胞の Axl をノックダウンした。siRNA トランスフェクション72時間後に HDM (40  $\mu$ g/mL)

を培養上清中に添加した。6時間後に RNA を回収し、*SOCS1* (A)、*SOCS3* (B) の相対的発現量を定量 PCR により比較した。結果は three well replicates の平均  $\pm$  標準偏差で示した (n = 1、n は実験回数)。各群の比較には、one way analysis of variance (ANOVA) 後に Tukey 検定を行った。\*P<0.05を表す。

*SOCS1*: suppressor of cytokine signaling 1、*SOCS3*: suppressor of cytokine signaling 3、N.S.: not significant。

## 図 26. Axl ノックダウンによる phospho A20と I $\kappa$ B $\alpha$ 発現変動の検討

(A-C) siRNA (siAxl #1、siAxl #2; 最終濃度2.5 nM) トランスフェクションにより BEAS-2B 細胞の Axl をノックダウンした。siRNA トランスフェクション72時間後に HDM (4  $\mu$ g/mL) を培養上清中に添加した。0分、30分後に細胞溶解液を回収し、phospho A20、total A20、I $\kappa$ B $\alpha$  の発現をウェスタンブロッティングで評価した。内因性コントロールには  $\beta$ -actin を用いた。

(A) 代表的なバンド画像。結果は three well replicates のうち代表的なもの1つを示した (n = 1、n は実験回数)。(B) total A20に対する phospho A20の比。(C)  $\beta$ -actin に対する I $\kappa$ B $\alpha$  の比。

結果は three well replicates の平均  $\pm$  標準偏差で示した (n=1、n は実験回数)。N.D.のサンプルは0として統計計算を実施した。Two way analysis of variance (ANOVA) 後に Tukey 検定を行った。\*P<0.05、\*\*\*P<0.001対 siNTC トランスフェクション後 HDM 刺激30分群を表す。

I $\kappa$ B $\alpha$ : nuclear factor  $\kappa$  B inhibitor  $\alpha$ 、phospho A20: phosphorylated A20、N.D.: not detected。

## 図 27. Axl によって発現制御を受ける気道上皮細胞におけるプロテアーゼインヒビターの検討

(A-B) siRNA (siAxl #1、siAxl #2; 最終濃度2.5 nM) トランスフェクションにより BEAS-2B 細胞の Axl をノックダウンした。siRNA トランスフェクション48時間後に RNA を回収し、*SLPI*(A)、*CSTA*(B) の相対的発現量を定量 PCR により比較した。結果は平均 ± 標準偏差で示した (n = 3、n は実験回数)。各群の比較には、one way analysis of variance (ANOVA) 後に Tukey 検定を用いた。\*P<0.05、\*\*P<0.01、\*\*\*P<0.001、\*\*\*\*P<0.0001 を表す。

*SLPI*: secretory leukocyte peptidase inhibitor、*CSTA*: cystatin A。

## 図 28. Axl による GM-CSF、RANTES を介した好酸球性気道炎症抑制の概念図 (本研究結果のまとめ)

Axl は *SLPI*、*CSTA* の発現を正に制御することでアレルゲンプロテアーゼに対して防御的に作用する。House dust mite は気道上皮基底細胞において IKK 複合体の活性化、*IκBα* の分解を経た NFκB の活性化により、気道上皮基底細胞による GM-CSF と RANTES の産生を促進させる。GM-CSF と RANTES は好酸球の気道組織への浸潤や生存延長を促進させることで好酸球性炎症を惹起する。House dust mite による刺激時は、Axl は IKK 複合体の抑制因子である A20のリン酸化促進を介して NFκB の活性を負に制御し、気道上皮基底細胞による GM-CSF と RANTES の産生を抑制することで好酸球性炎症に対して防御的に機能する。重

症喘息では気道上皮基底細胞における Axl の発現が低下し、上記の Axl による防御的機能が減弱することで、ステロイド抵抗性の2型気道炎症が誘導される可能性が示唆される。

P: リン酸化状態を意味する。

IKK: IκB kinase、NFκB: nuclear factor κ B。

## 図 29. Axl の発現低下によって誘導される2型炎症、リモデリング、ステロイド抵抗性の

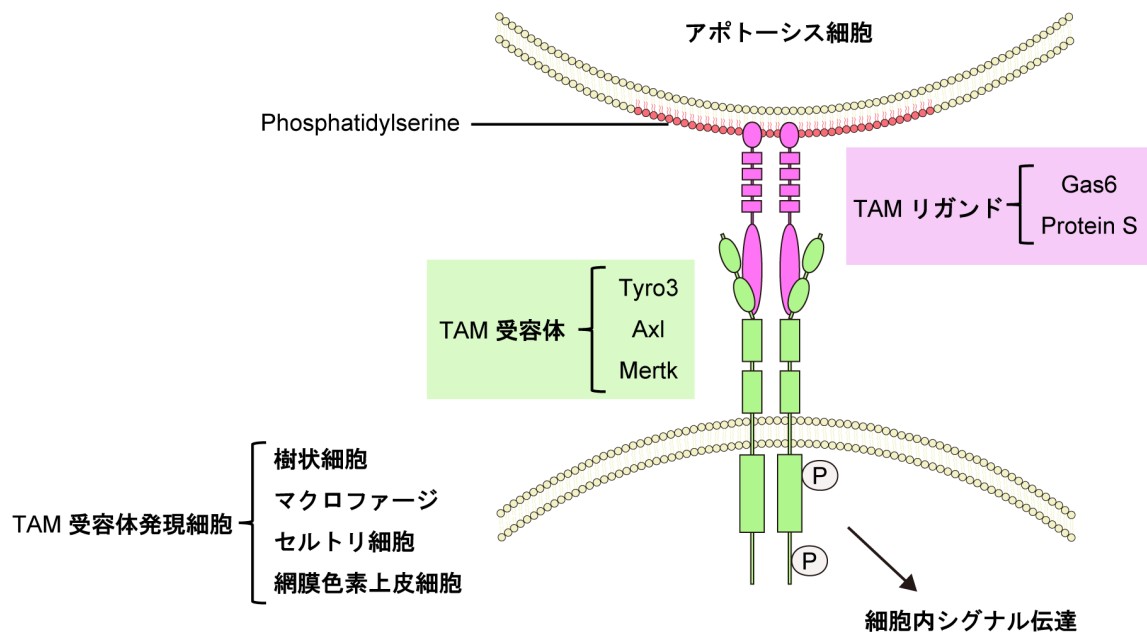
### 概念図 (本研究より導かれる仮説)

Axl は、コルチコステロイド存在下においても A20のリン酸化を介して NFκB を抑制し、GM-CSF と RANTES の遺伝子発現を抑制する。GRα の感受性低下、GRβ の発現亢進、HDAC の活性低下などがコルチコステロイドの抗炎症作用を減弱する。GM-CSF と RANTES は好酸球の活性化と気道組織への遊走を促進する。GM-CSF は樹状細胞を活性化することにより Th2細胞を誘導する。Th2細胞から産生される IL-5は好酸球の活性化と気道組織への遊走を促す。Th2細胞が産生する IL-4、IL-13は B 細胞の IgE 産生を誘導し、IgE によりマスト細胞が活性化される。好酸球とマスト細胞はエフェクター細胞として気道組織傷害を引き起こし、リモデリングを誘導する。Th2細胞によって産生される IL-13は杯細胞過形成、気道周囲の線維化、気道平滑筋の増生を惹起しリモデリングを促進する。

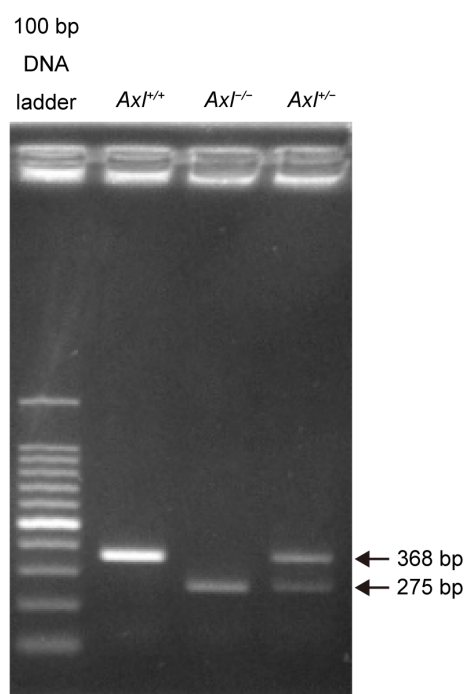
GR: glucocorticoid receptor、HDAC: histone deacetylase、Th2: type 2 helper T。

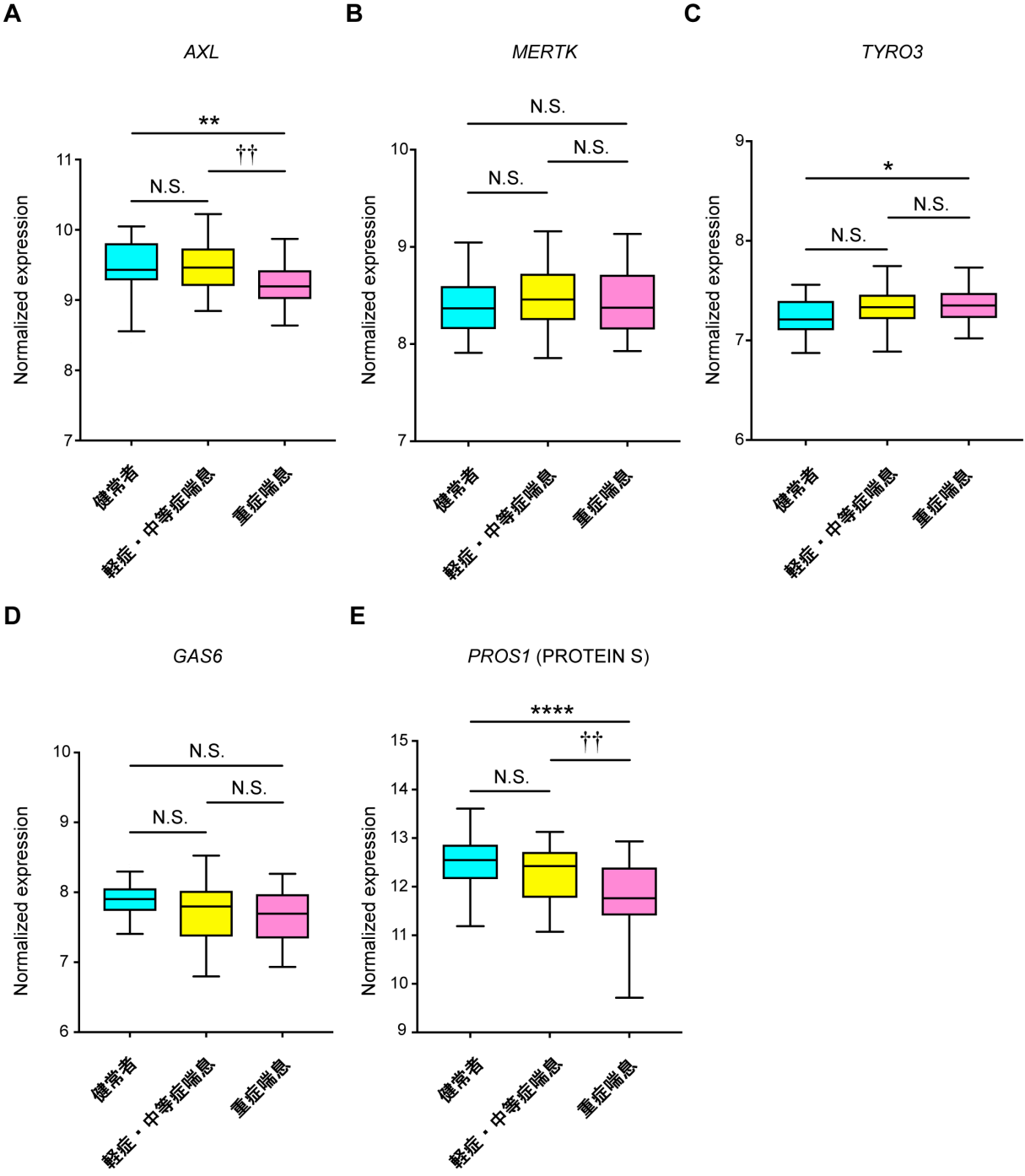


TAM 受容体とリガンドの模式図

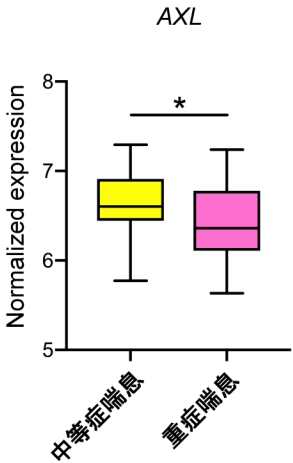


Lemke G, Rothlin CV. Immunobiology of the TAM receptors. *Nat Rev Immunol* 2008;8:327-336. より改変引用

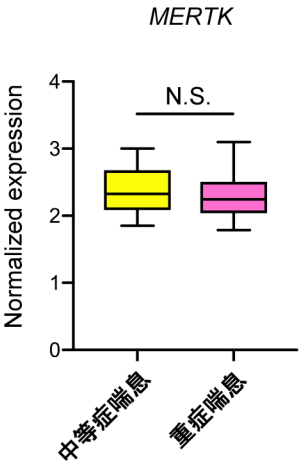




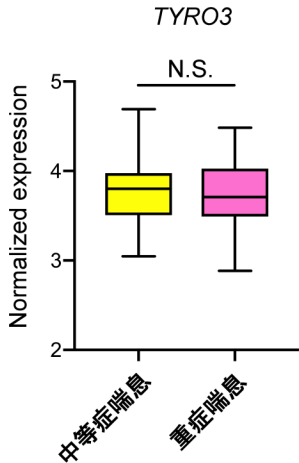
**A**



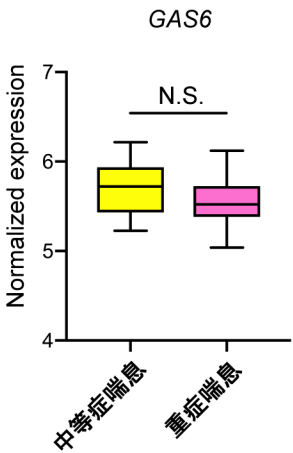
**B**



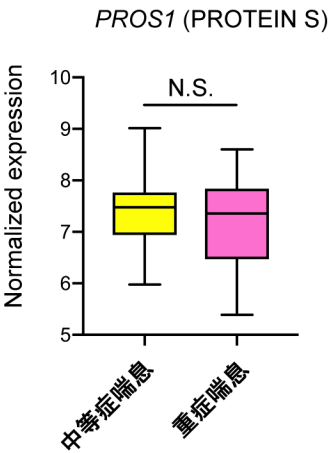
**C**



**D**



**E**



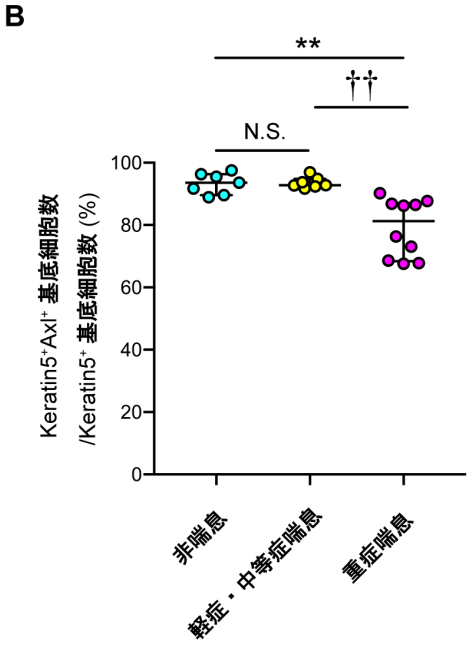
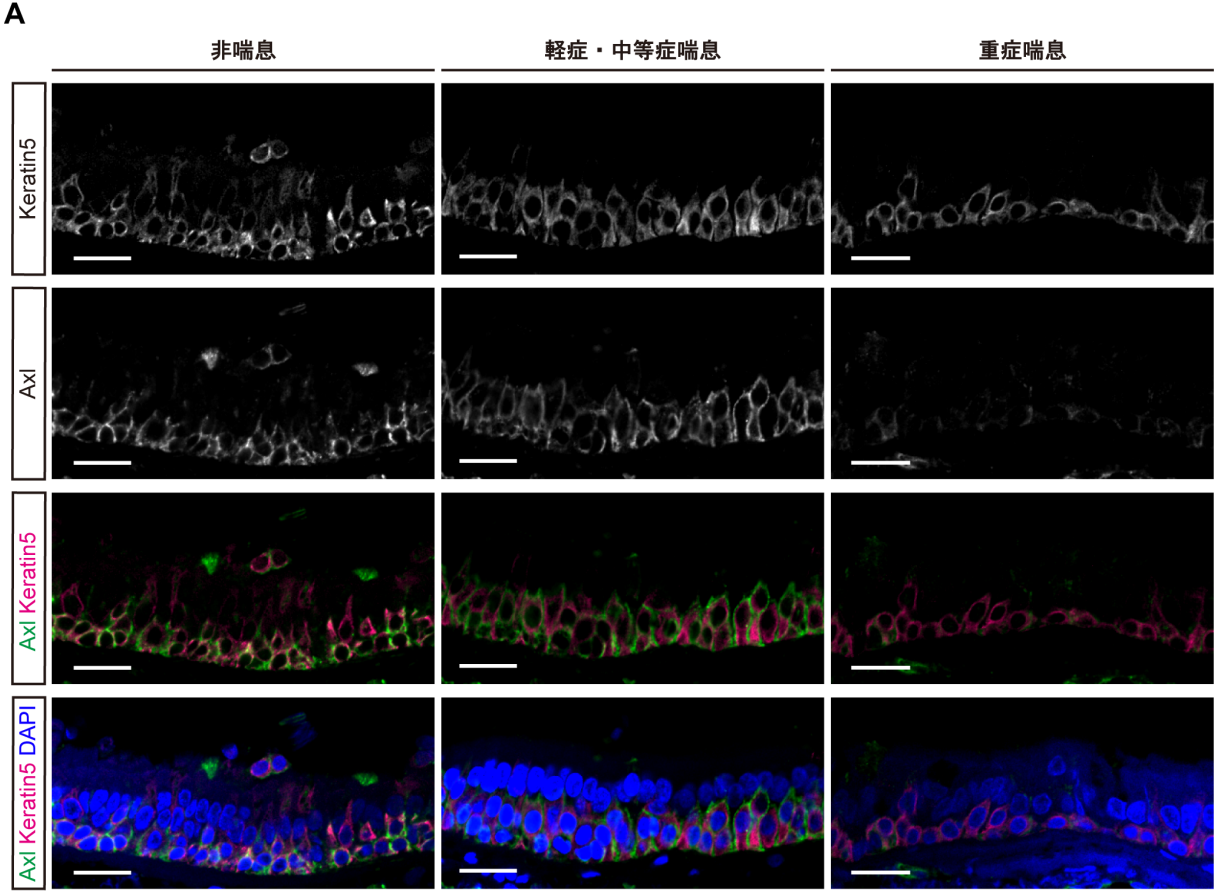
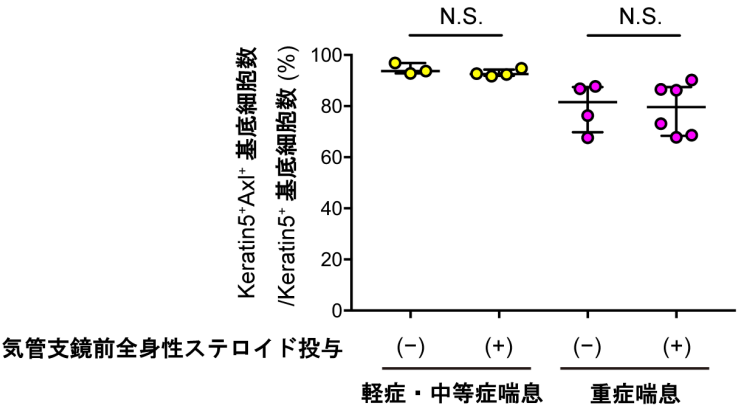
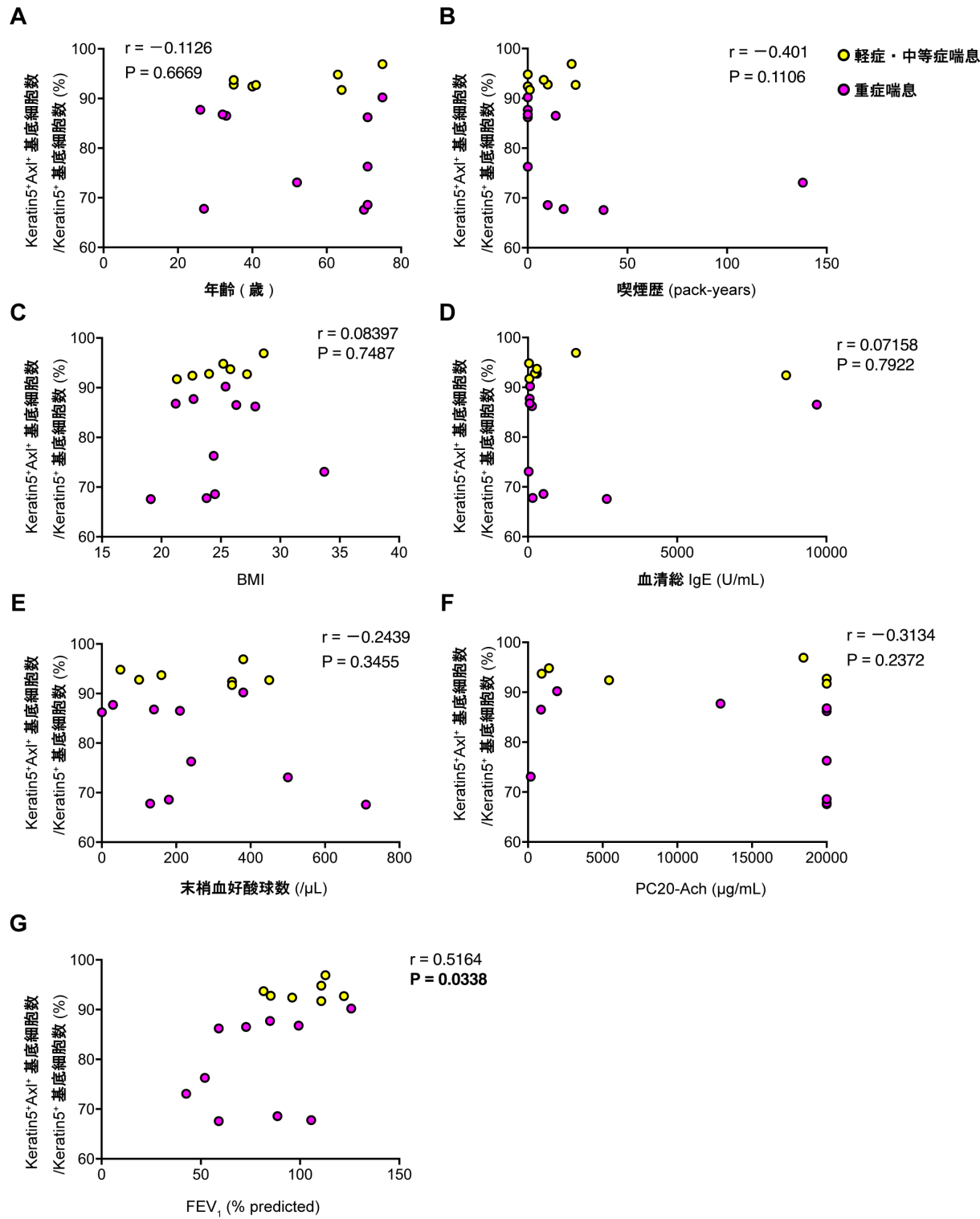
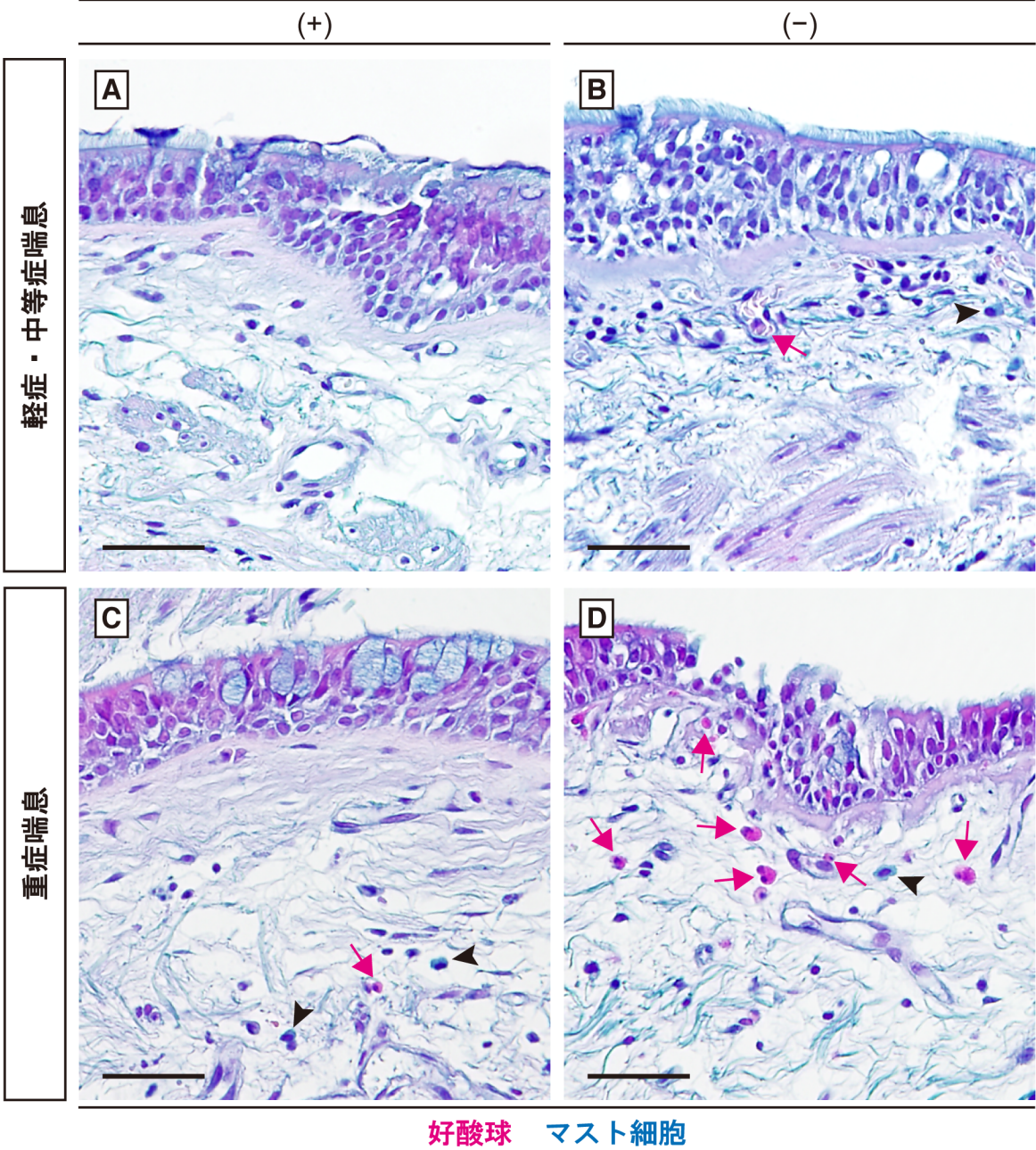


図6



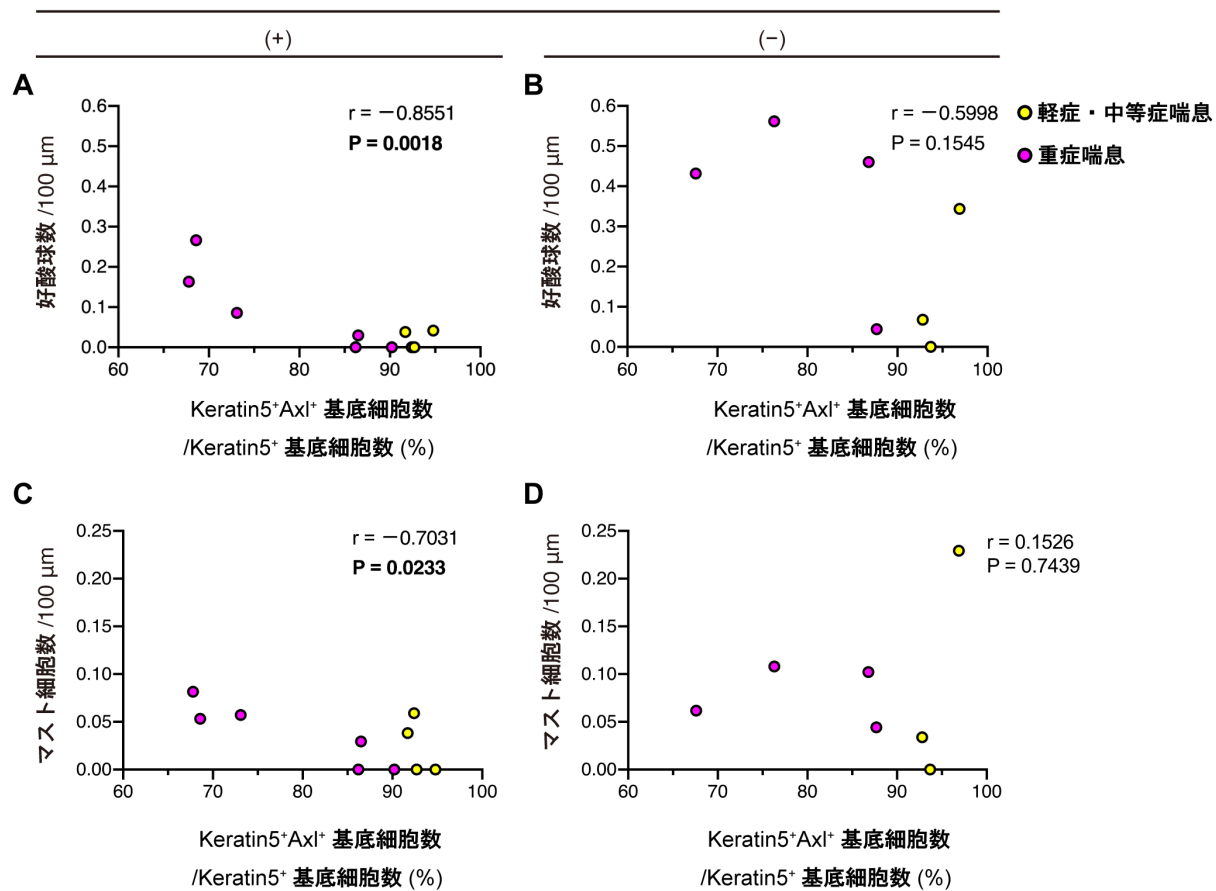


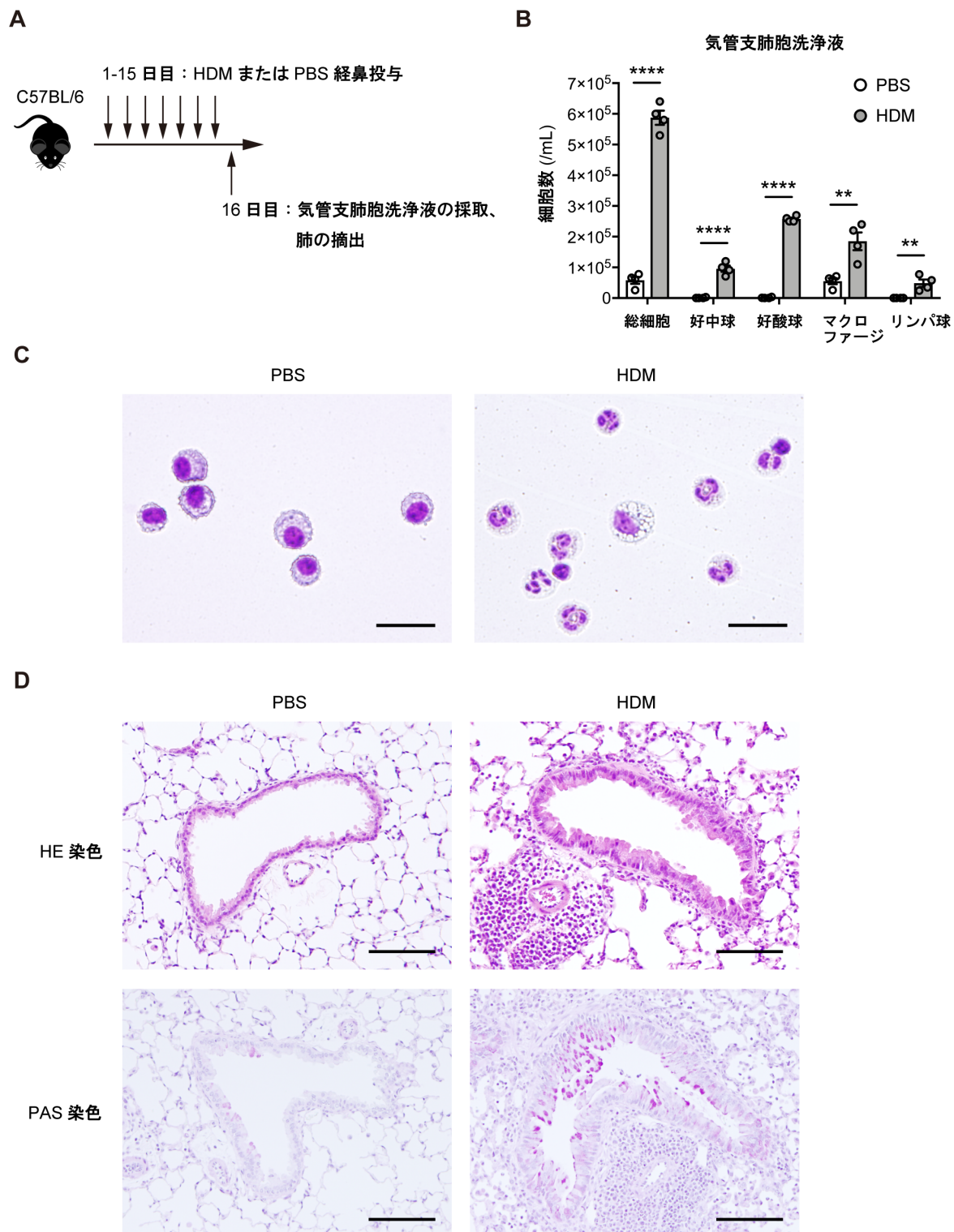
気管支鏡前全身性ステロイド投与

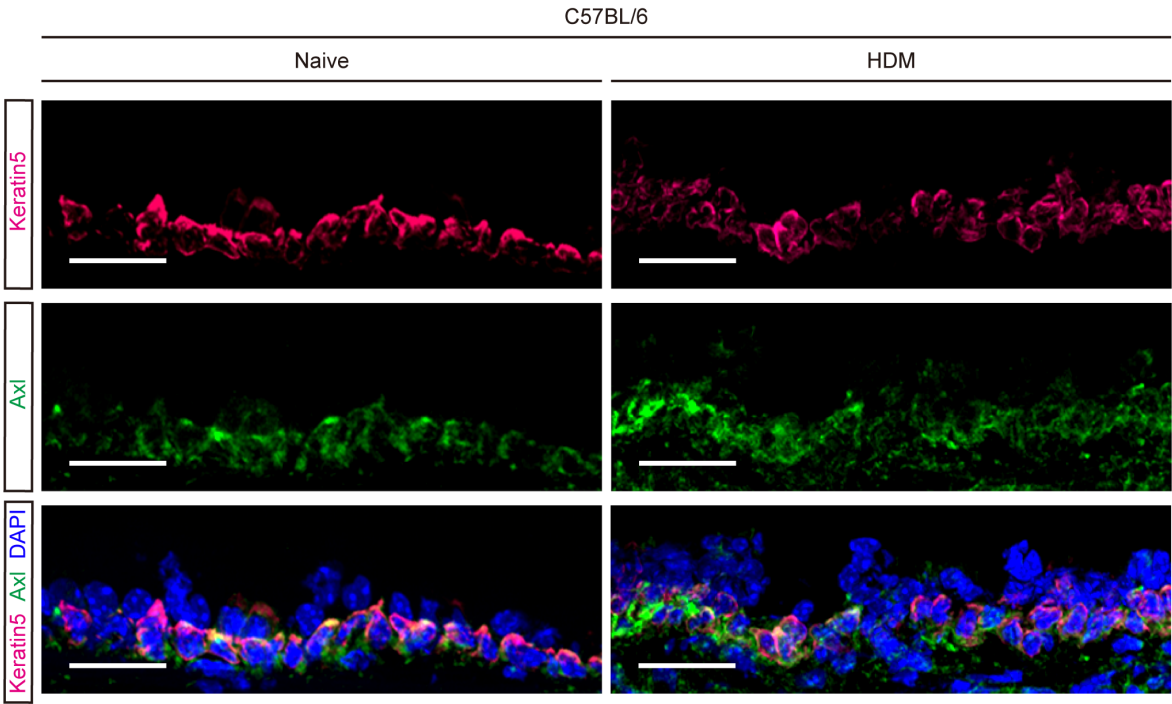


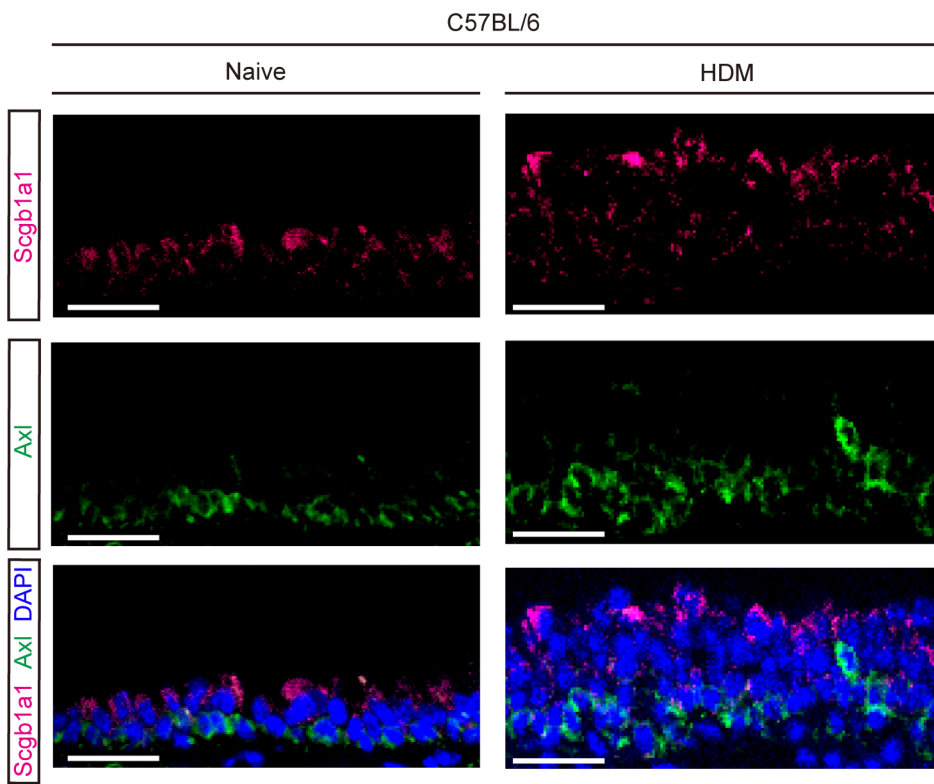


気管支鏡前全身性ステロイド投与









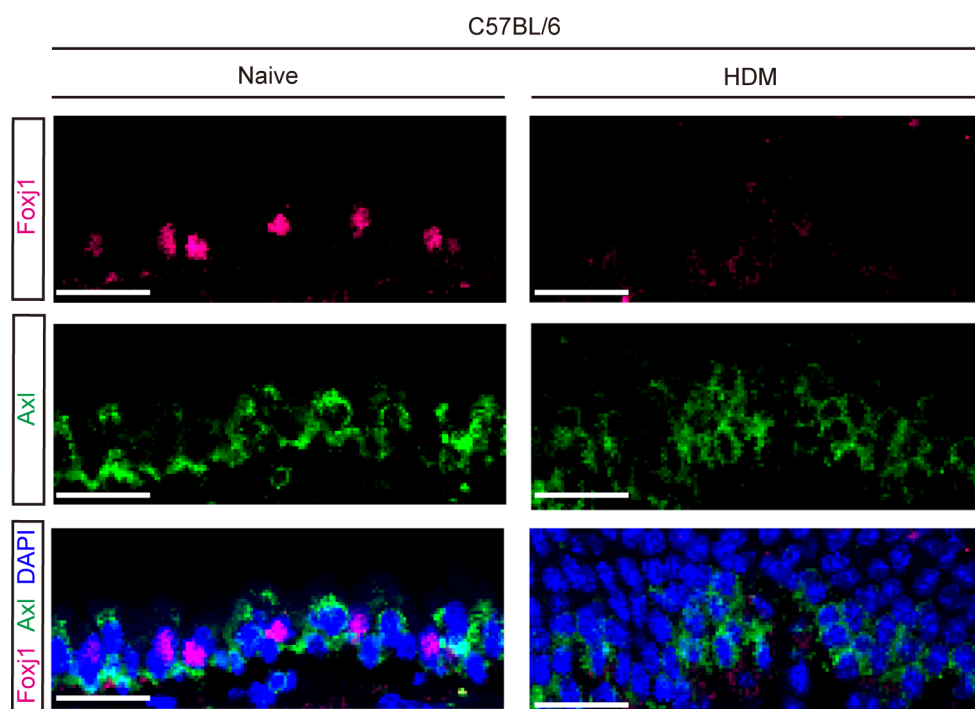
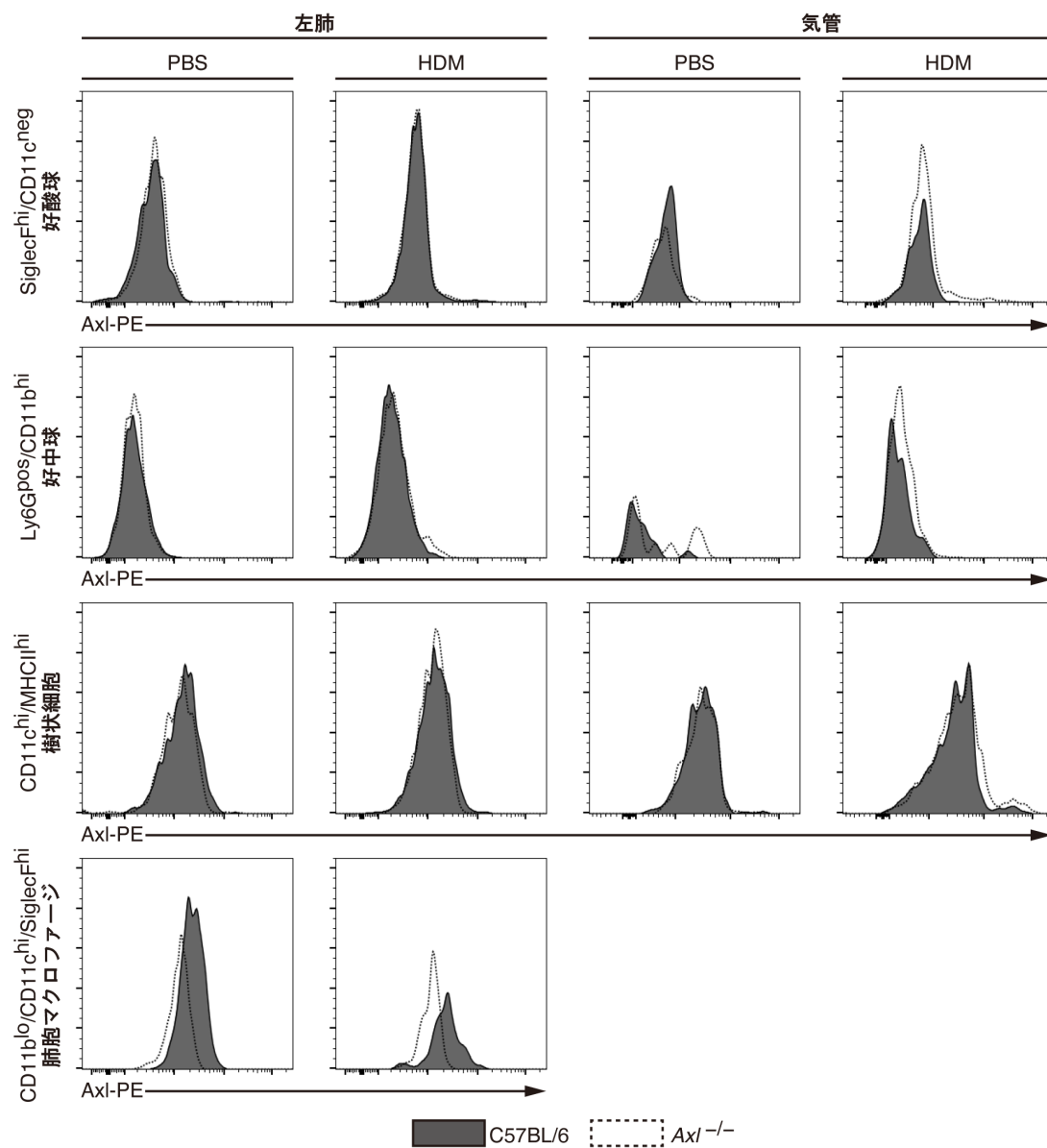
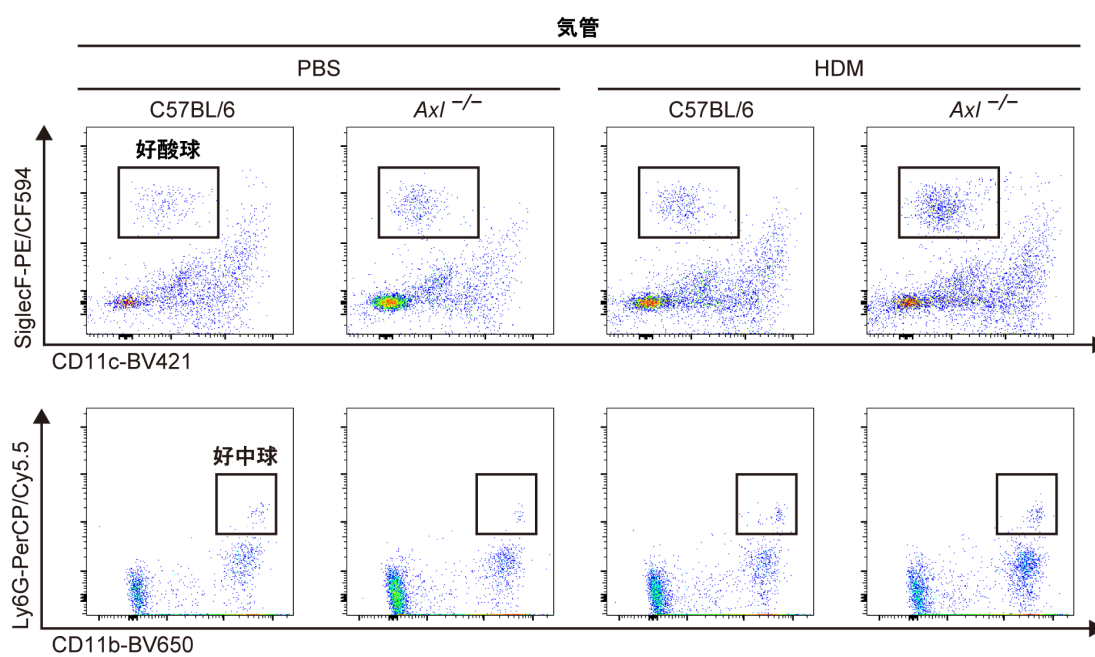


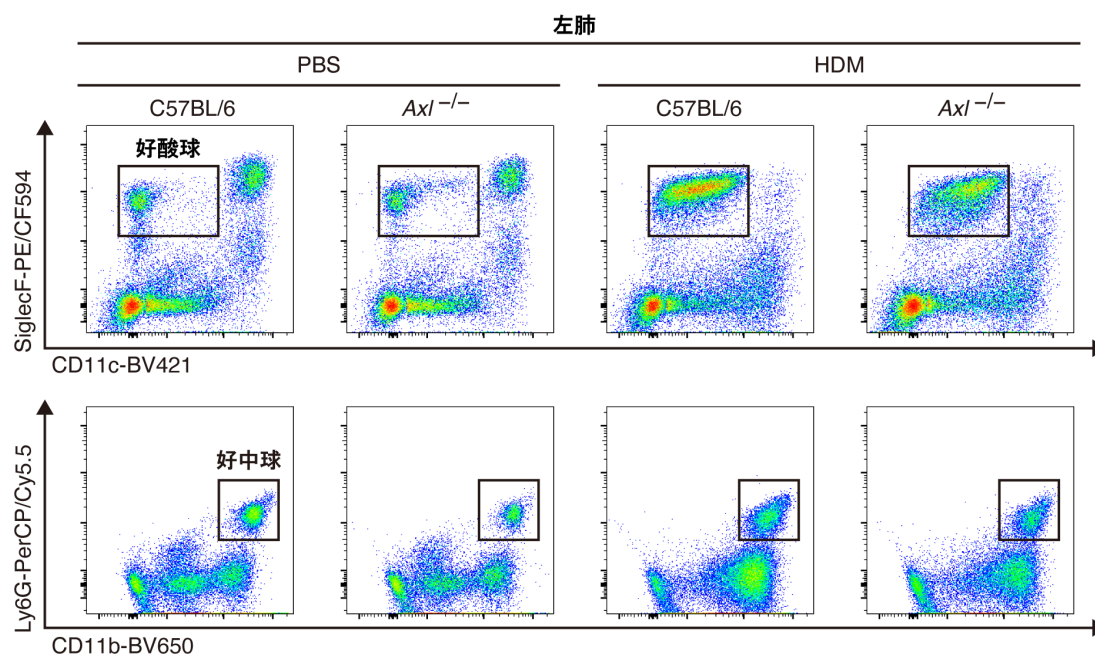
図14



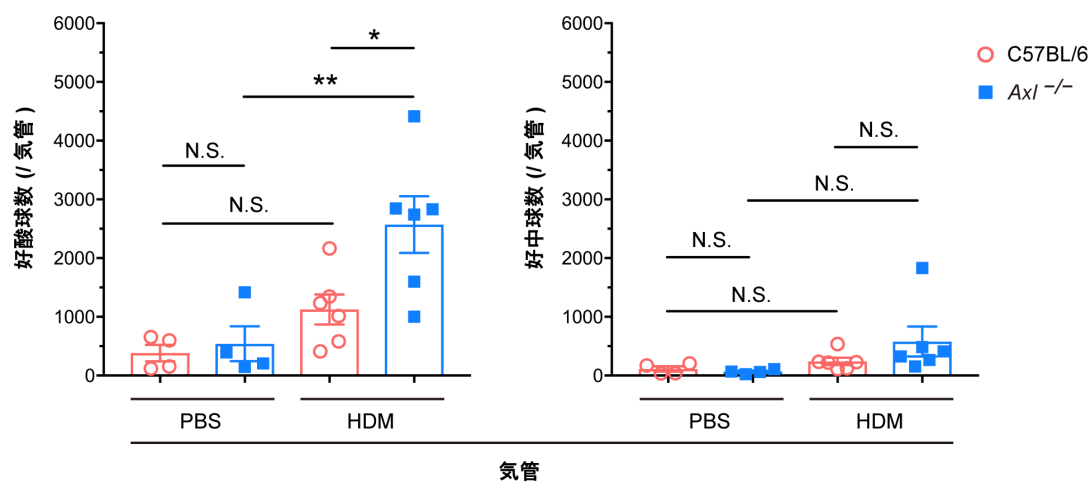
A



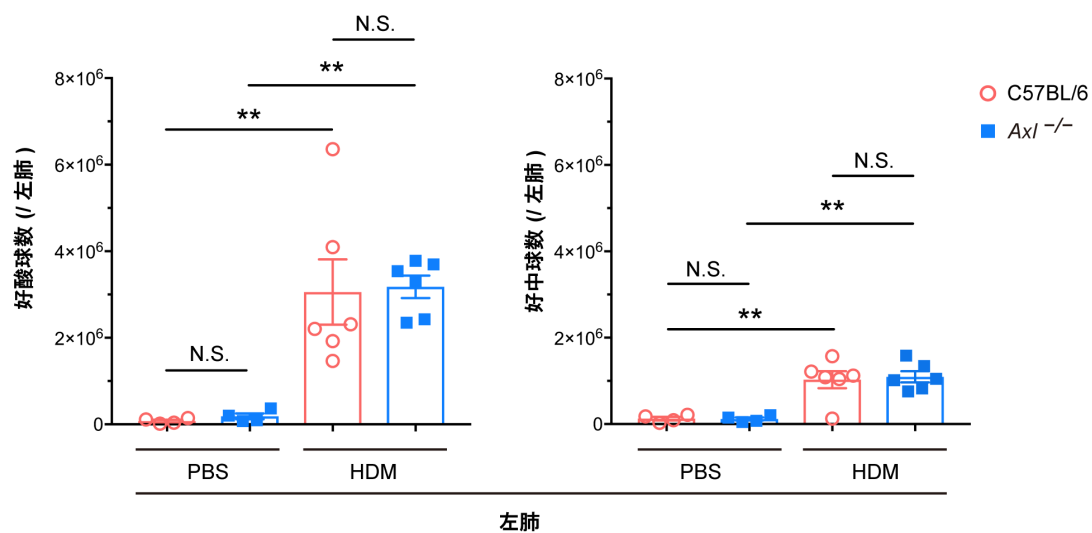
B



A

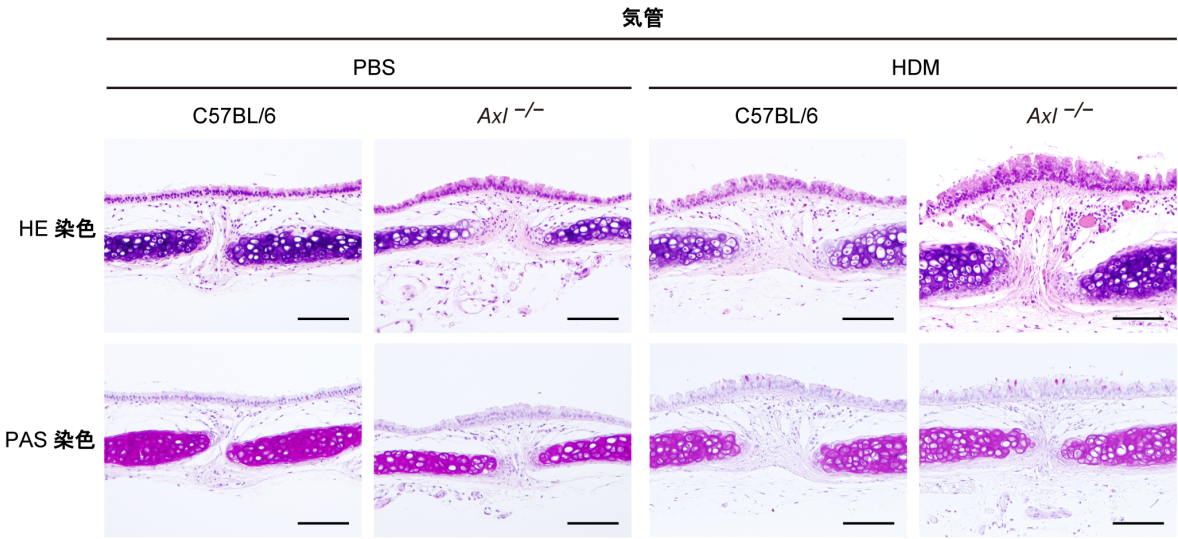


B

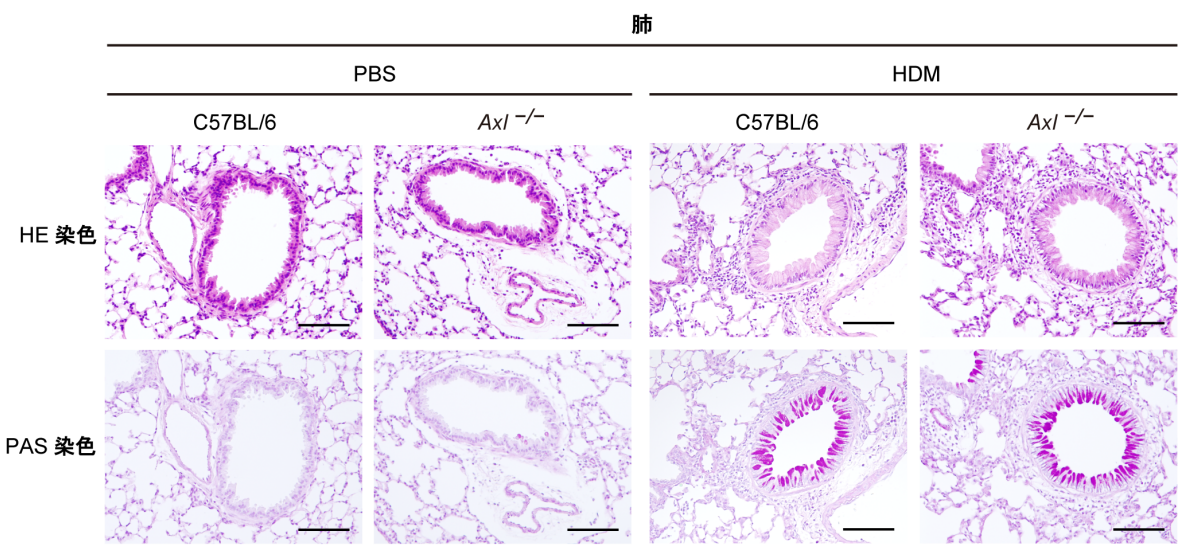




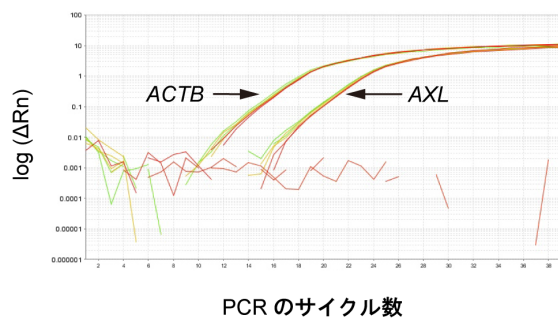
A



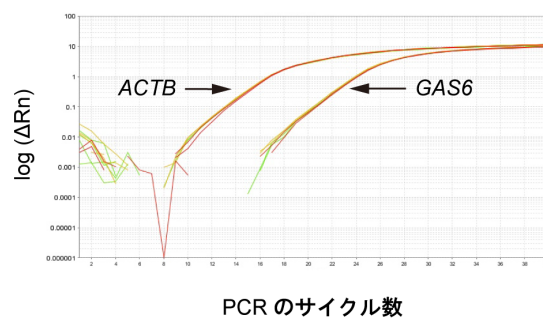
B



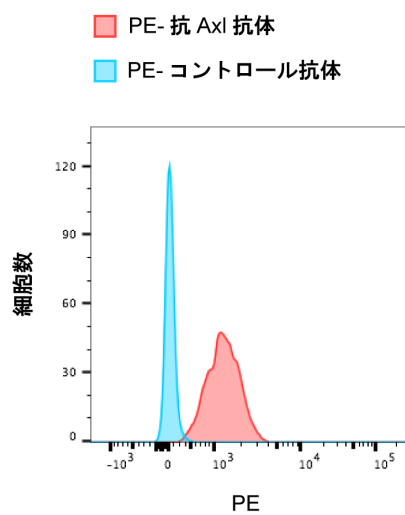
**A**



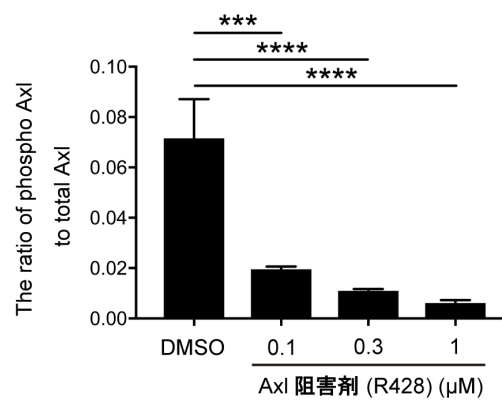
**B**

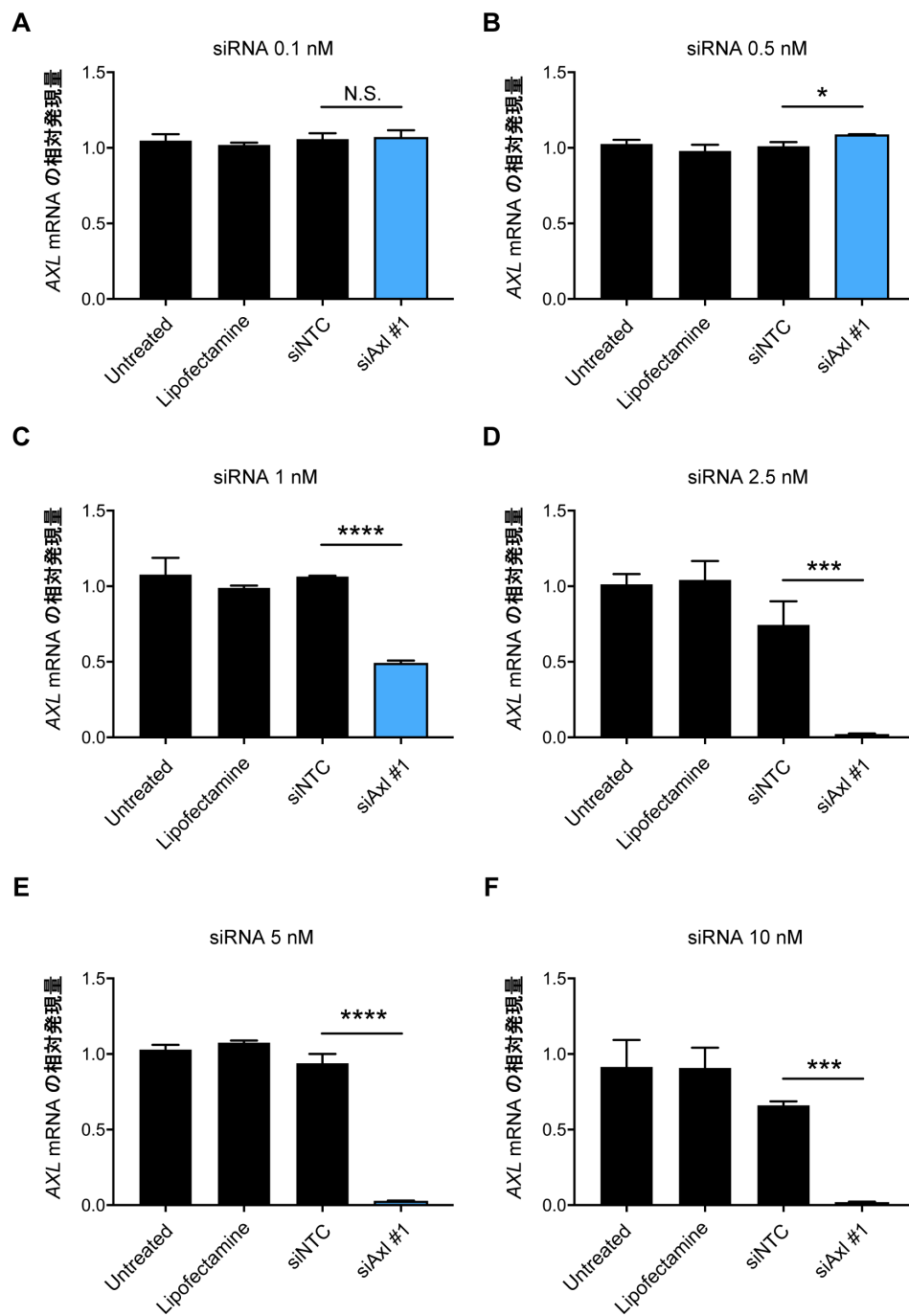


**C**

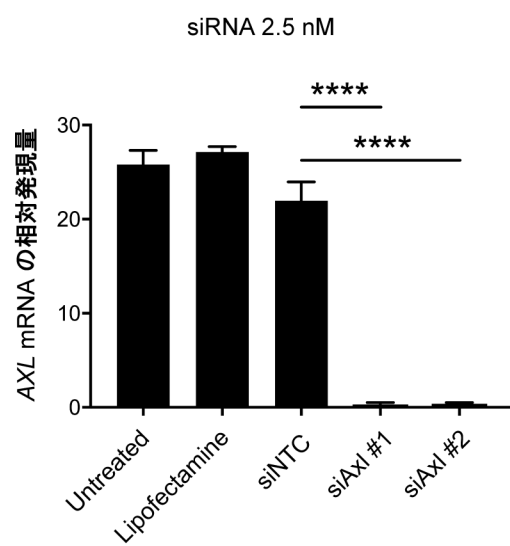


**D**

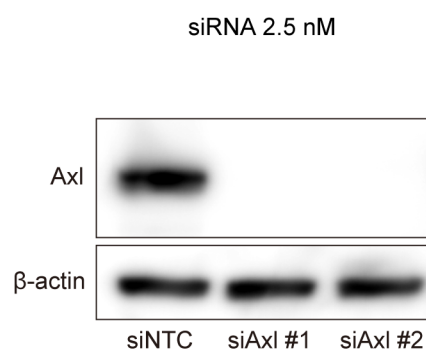




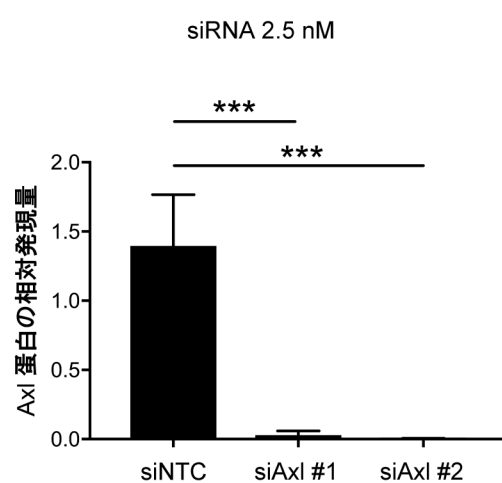
**A**



**B**

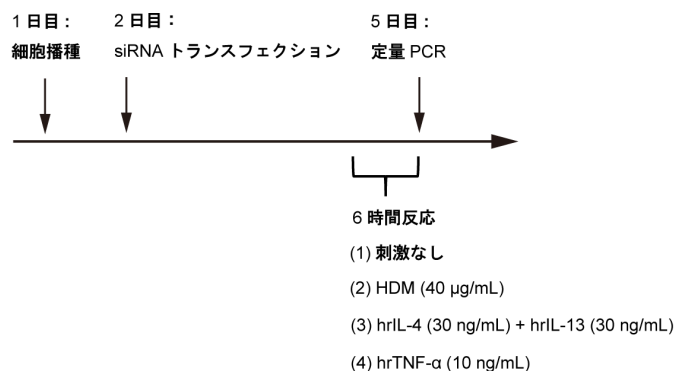


**C**



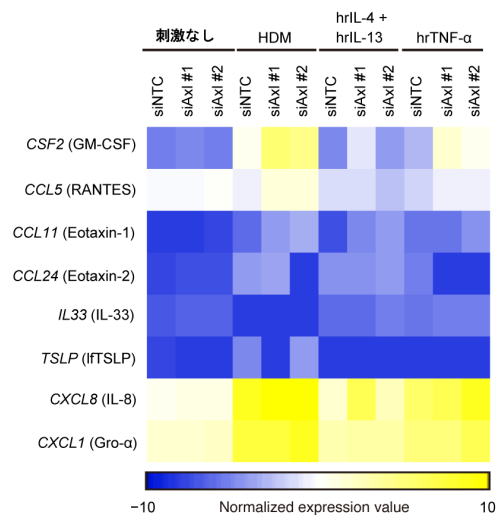
**A**

BEAS-2B 細胞 ( ヒト気道上皮細胞株、培地にヒドロコルチゾンを含む )



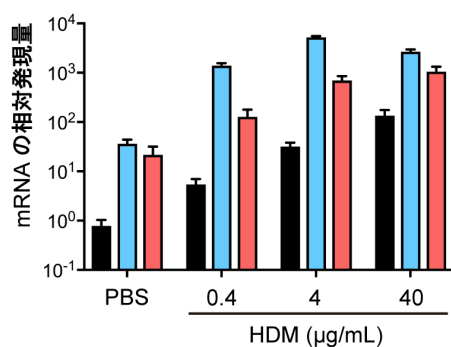
**B**

mRNA の相対発現量



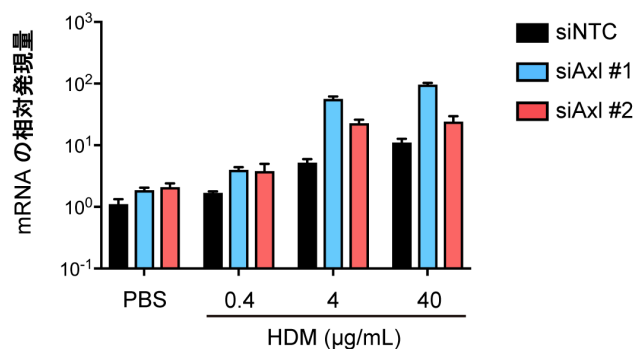
**C**

CSF2 (GM-CSF)



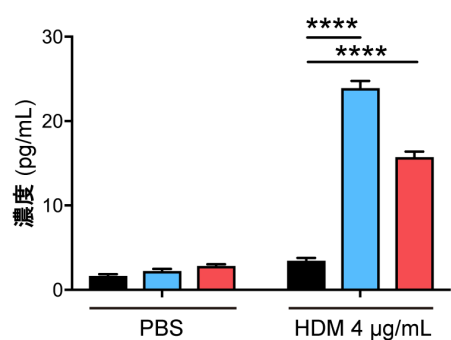
**D**

CCL5 (RANTES)



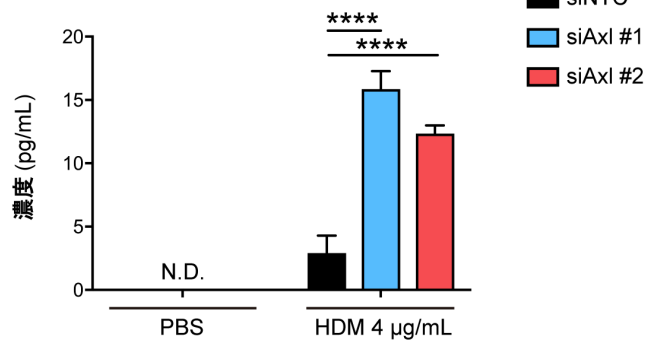
**E**

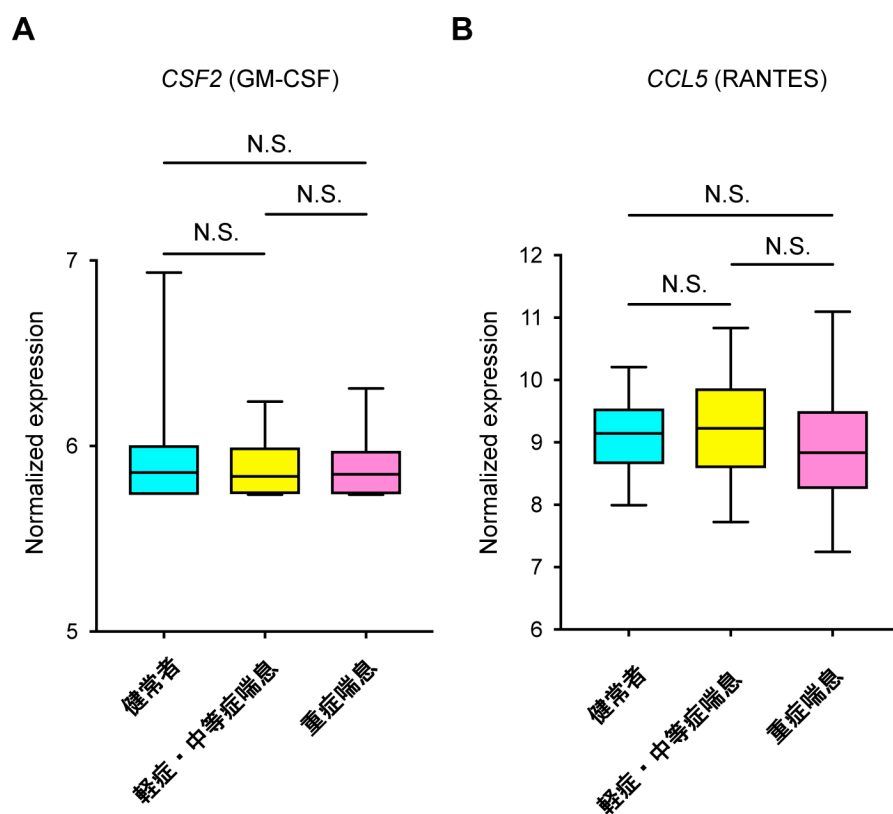
GM-CSF

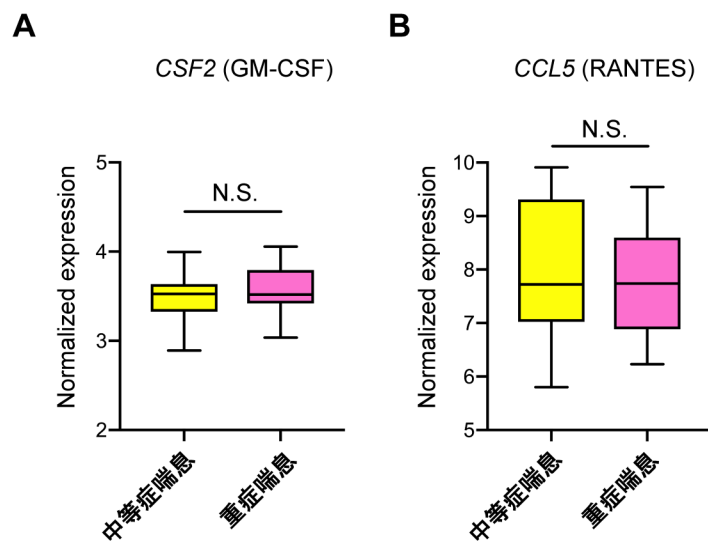


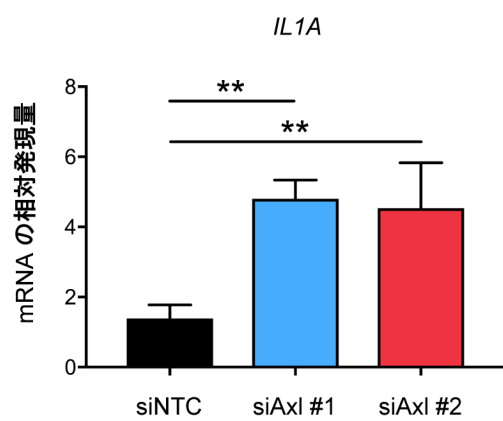
**F**

RANTES



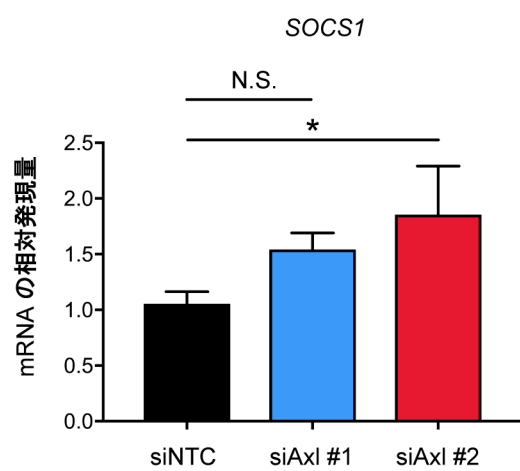




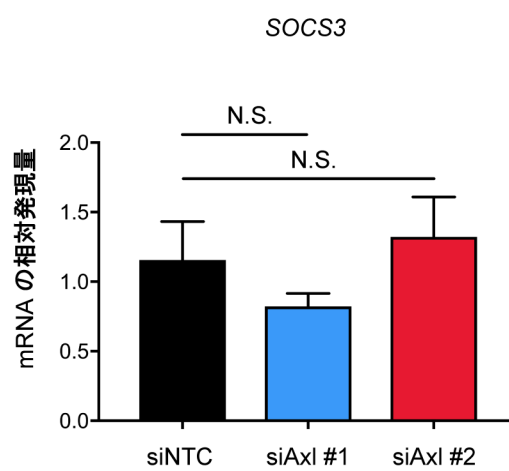




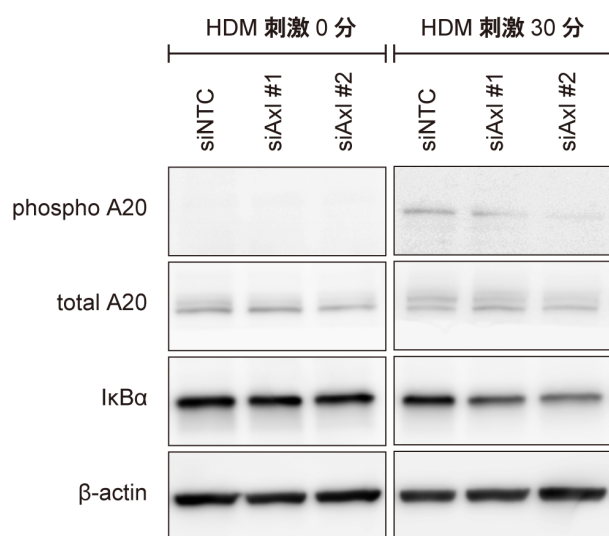
**A**



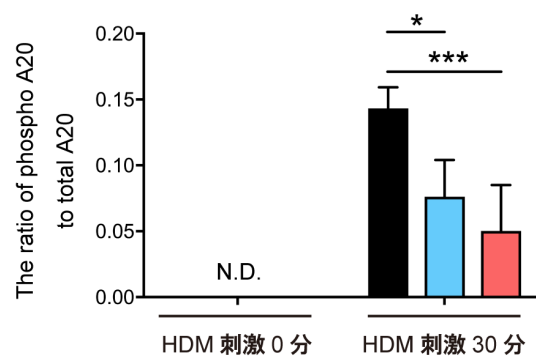
**B**



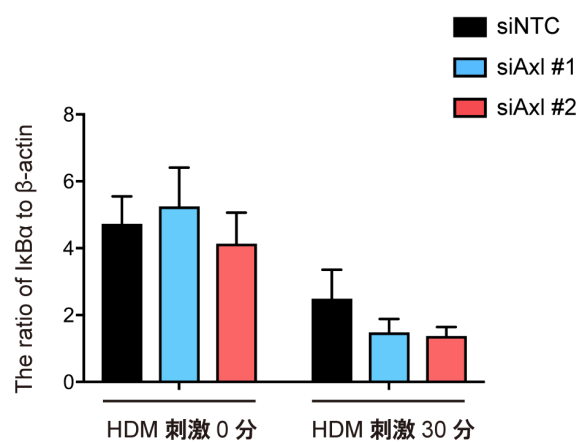
**A**



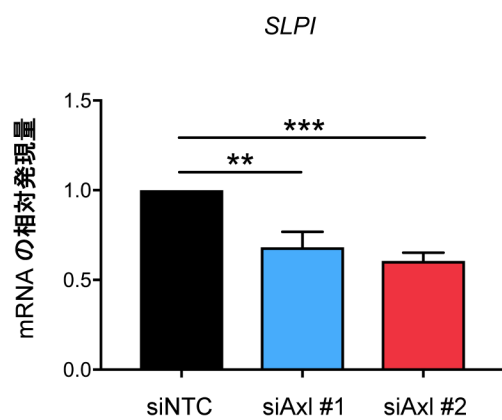
**B**



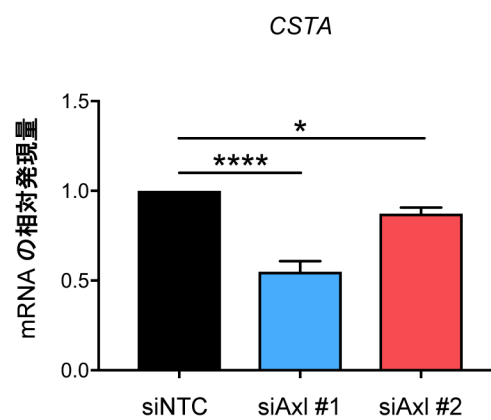
**C**



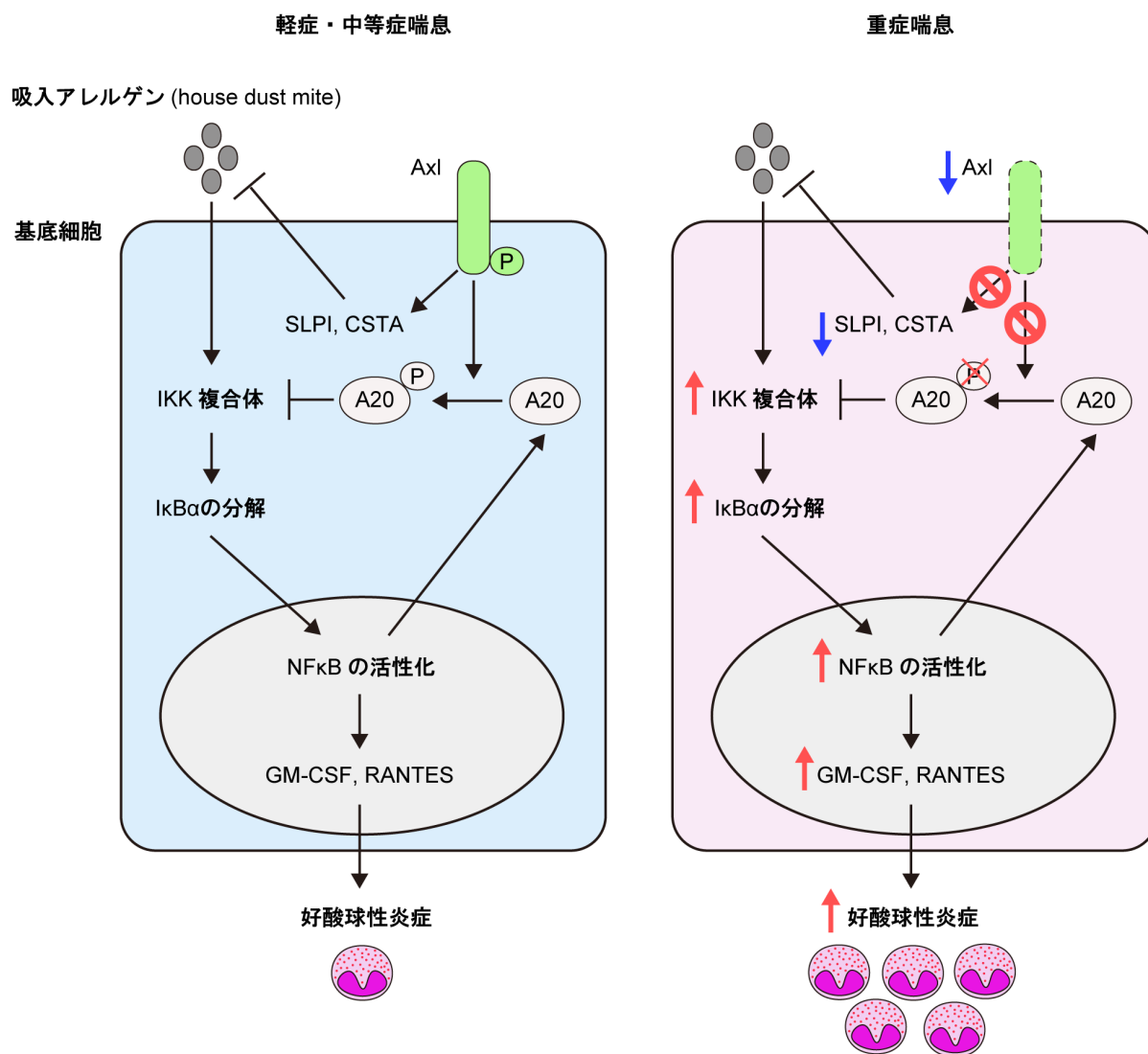
**A**



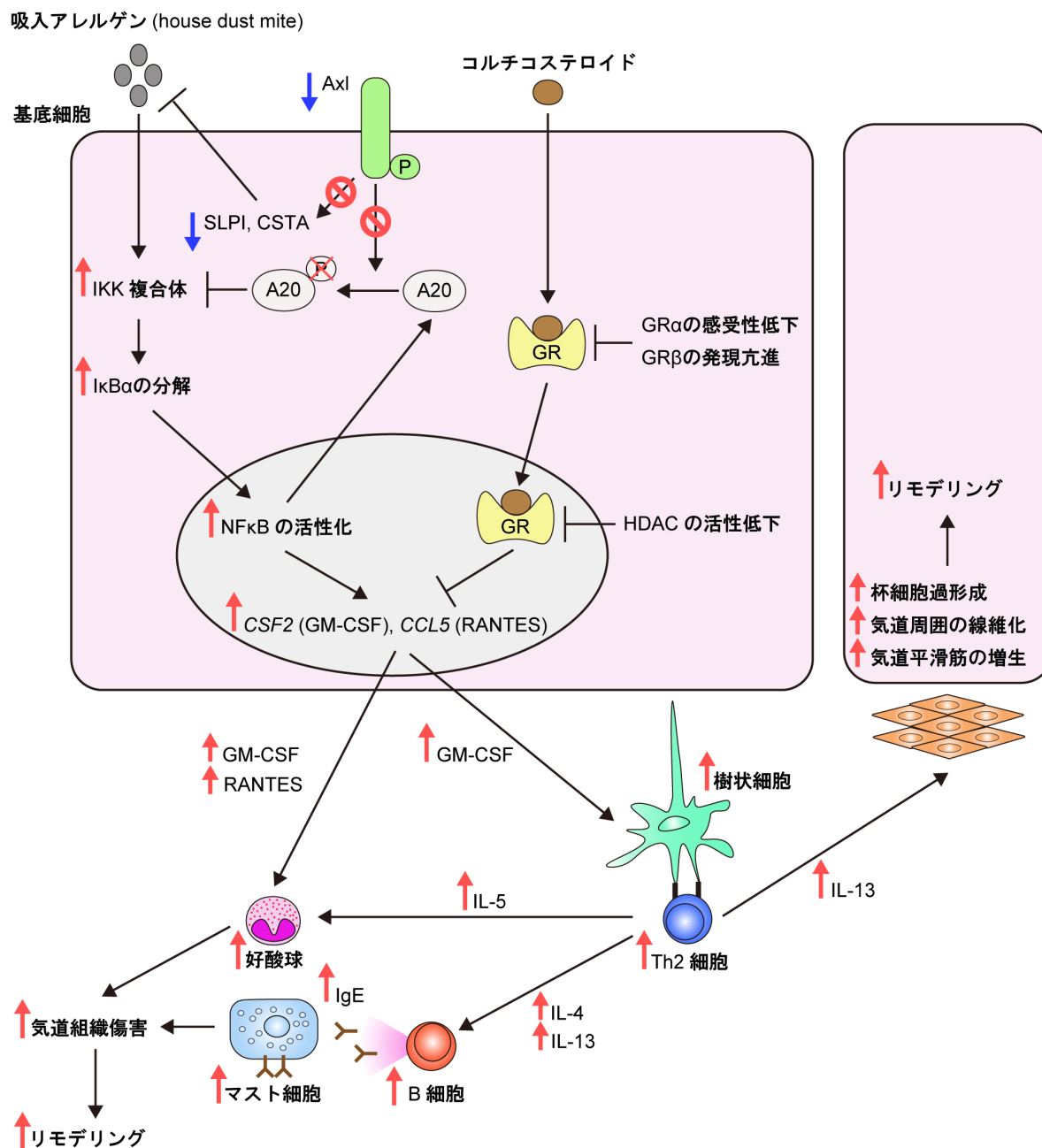
**B**



Axl による GM-CSF、RANTES を介した好酸球性気道炎症抑制の概念図 (本研究結果のまとめ)



Axl の発現低下によって誘導される 2 型炎症、リモデリング、ステロイド抵抗性の概念図 (本研究より導かれる仮説)



Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. *Nat Immunol* 2015;16:45-56 より改変引用  
 Barnes PJ, Adcock IM, Ito K. Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. *Eur Respir J* 2005;25:552-563 より改変引用

表1. 気管支生検組織の患者背景

	非喘息	軽症・中等症喘息	重症喘息
対象者 (人)	7	7	10
性別、男性 / 女性 (人)	4 / 3	5 / 2	6 / 4
年齢 (歳)	64 (60-76)	41 (35-64)	61 (31-71)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.7 (18.3-29.1)	25.2 (22.6-27.2)	24.5 (22.3-26.7)
非喫煙者/既喫煙者/現喫煙者 (人)	2/4/1	2/1/4	5/4/1
喫煙本数 (pack-years)	26 (0-61) ※	8 (0-22)	5 (0-23)
喘息罹病期間 (年)	NA	6 (1-13)	11 (4-33)
アトピー素因 (人、%)	NA	3 (43)	7 (70)
合併症			
アトピー性皮膚炎 (人、%)	0 (0)	4 (57)	4 (40)
慢性副鼻腔炎 (人、%)	0	4 (57)	3 (30)
血液検査			
血清総 IgE (U/mL)	NA	297 (48-1610)	134 (60-1581)
末梢白血球数 (/μL)	5180 (4720-7120)	6270 (5580-8530)	6565 (4515-11900)
末梢血好酸球数 (/μL)	70 (50-110)	350 (100-380)	195 (105-410)
呼吸機能検査			
FEV <sub>1</sub> (% predicted)	NA	110.7 (85.2-112.8)	78.8 (57.2-100.9)
FVC (% predicted)	NA	110.9 (96.7-124.9)	89.0 (74.2-116.0)
FEV <sub>1</sub> /FVC (%)	NA	81.0 (77.5-82.8)	72.5 (61.0-81.7)
PC20-Ach (μg/mL)	NA	11938 (1283-20000)	20000 (1684-20000)
喘息のコントローラー治療 (人、%)			
吸入ステロイドのみ	NA	2 (29)	0 (0)
吸入ステロイド+LABA*	NA	4 (57)	10 (100)
LAMA	NA	3 (43)	5 (50)
ロイコトリエン拮抗薬*	NA	4 (57)	7 (70)
テオフィリン**	NA	2 (29)	6 (60)
気管支鏡検査前のステロイド投与			
検体採取日から 21 日以内に全身性ステロイド投与歴のある対象者 (人、%)	1 (14)	4 (57)	6 (60)
検体採取時における全身性ステロイド中止後日数 (日)	NA	12 (6-15)	9 (7-14)

数値は中央値 (四分位範囲) で示した。

人数の比較には $\chi^2$ 検定を用いた。\*P<0.05、\*\*P<0.01を表す。

3群の比較には Dunn の多重比較検定後に Kruskal-Wallis 検定を使用し、2群の比較には

Mann-Whitney 検定を用いた。群間で有意差のある項目はなかった。

※ 現喫煙者1名の喫煙本数が不明である。

BMI: body mass index

FEV<sub>1</sub>: forced expiratory volume in 1 second (1秒量)

FEV<sub>1</sub> (% predicted): % predicted values of forced expiratory volume in 1 second (予測1秒量に対する比率)

FVC: forced vital capacity (努力肺活量)

FVC (% predicted): % predicted values of forced vital capacity (予測努力肺活量に対する比率)

IgE: immunoglobulin E

LABA: long-acting  $\beta_2$  agonist

LAMA: long-acting muscarinic antagonist

Pack-years = (1日の喫煙本数 / 20本) × 喫煙年数

PC20-Ach: provocative concentration of acetylcholine that results in a 20% fall in FEV<sub>1</sub> (1秒量を20%低下させるのに要するアセチルコリンの濃度)

NA: not applicable (該当なし)

表2. マウス気管および肺の単一細胞懸濁液のフローサイトメトリーで使用した抗体

抗体	蛍光色素	メーカー	型番	アイソタイプ	クローン	最終濃度/ 希釈倍率
Ly-6G	PerCP/Cy5.5	BioLegend	127615	Rat IgG2a, $\kappa$	1A8	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
CD3	APC/Fire750	BioLegend	100247	Rat IgG2b, $\kappa$	17A2	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
NK1.1	APC/Fire750	BioLegend	108751	Mouse IgG2a, $\kappa$	PK136	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
CD11c	BV421	BioLegend	117329	Armenian Hamster IgG	N418	0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
CD45	BV510	BioLegend	103138	Rat IgG2b, $\kappa$	30-F11	0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
CD220	APC/Fire750	BioLegend	103259	Rat IgG2a, $\kappa$	RA3-6B2	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
CD11b	BV650	BioLegend	101239	Rat IgG2b, $\kappa$	M1/70	0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Axl	PE	R&D systems	FAB8541P	Rat IgG2a	175128	10 倍希釈
SiglecF	PE/CF594	BD Biosciences※	562757	Rat IgG2a, $\kappa$	E50-2440	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
MHC class II	PE/Cy5	BioLegend	107611	Rat IgG2b, $\kappa$	M5/114.15.2	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$

※BD Biosciences, San Jose, CA, USA

APC: allophycocyanin

BV: Brilliant Violet

Ig: immunoglobulin

PE: phycoerythrin

PerCP: Peridinin-chlorophyll-protein Complex



表 3. Keratin5<sup>+</sup>Axl<sup>+</sup>基底細胞数/Keratin5<sup>+</sup>基底細胞数に関する多変量線形回帰分析

	偏回帰係数	P 値
喫煙歴 (pack-years)	−0.4021	0.2886
BMI	3.623	0.1243
血清総 IgE	−0.001312	0.537
末梢血好酸球数	60.44	0.1877
PC20-Ach	−0.0001642	0.7932
FVC (% predicted)	−0.7918	0.1191
FEV <sub>1</sub> (% predicted)	0.3139	0.5297